

Die frühe Bildung der Teilungszone bei der Kellerassele (*Porcellio scaber*)

D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung des akademischen Grades

D o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von Dipl.-Biol. Franziska Schneider (geb. Meusel)

Präsidentin der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Lebenswissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Bernhard Grimm

Gutachter/innen: 1. Prof. Dr. Gerhard Scholtz
 2. PD Dr. Thomas Stach

Tag der mündlichen Prüfung: 31. Januar 2020

INHALTSVERZEICHNIS

I. ZUSAMMENFASSUNG.....	V
II. ABSTRACT	VII
III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	VIII
IV. TABELLENVERZEICHNIS.....	IX
V. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	X
VI. EINHEITENVERZEICHNIS.....	XI
1. EINLEITUNG	1
1.1 Frühe Entwicklung der Arthropoden.....	1
1.2 Frühe Entwicklung der Malacostraca	3
1.3 Teloblastenbildung bei Isopoden	6
1.4 Methoden in der Entwicklungsbiologie	7
1.5 Zielstellung der Dissertation.....	8
2. MATERIAL UND METHODEN	10
2.1 Tierhaltung	10
2.2 Gewinnung der Embryonen	11
2.3 Vorbereitung für Vitalfärbungen	12
2.3.1 <i>Präparation der Embryonen</i>	12
2.3.2 <i>Vitalfärbung und Montage</i>	12
2.3.3 <i>4D-Mikroskopie</i>	15
2.3.4 <i>Datenanalyse mit FIJI (MaMuT)</i>	16
2.4 Terminologie	18
2.5 Bild- und Videobearbeitung.....	21
3. ERGEBNISSE	22
3.1 Vorgang der Zellmarkierung.....	22
3.2 Keimscheibenbildung.....	23

3.2.1	<i>Frühe Keimscheibenbildung</i>	23
3.2.2	<i>Bildung von Zellmembranen während der Keimscheibenbildung</i>	25
3.2.3	<i>Späte Keimscheibe</i>	26
3.2.4	<i>Beobachtungen während der Gastrulation</i>	28
3.3	Formierung der Ektoteloblasten	31
3.4	Zellteilungsmuster der Ektoteloblasten	33
3.4.1	<i>Bildung der ersten e-Reihe (eI)</i>	34
3.4.2	<i>Bildung der zweiten e-Reihe (eII)</i>	35
3.4.3	<i>Bildung der dritten e-Reihe (eIII)</i>	38
3.4.4	<i>Bildung der vierten e-Reihe (eIV) und Beginn der mitotischen Teilungen</i>	39
3.4.5	<i>Teilungsdauer</i>	42
3.5	Zellen nicht-ektoteloblastischen Ursprungs.....	44
3.5.1	<i>Formierung der Reihen A und B (E-Reihen)</i>	44
3.5.2	<i>Zellteilungen in der Reihe AB</i>	45
3.5.3	<i>Zellen, die Teile der späteren Mittellinie bilden</i>	48
3.6	Formierung der Zellen des inneren Halbkreises	50
3.7	Synchronisation zwischen den Zellgruppen	51
4.	DISKUSSION	56
4.1	Bedeutung der Zellmarkierung zur Untersuchung der Gastrulation	56
4.2	Bildung und Differenzierung der Keimscheibe	59
4.3	Ektoteloblasten innerhalb der Malacostraca	61
4.4	Bildung der Ektoteloblasten	62
4.4.1	<i>Phasen der Bildung eines Ektoteloblasten</i>	62
4.4.2	<i>Determinierung der Ektoteloblasten</i>	63
4.4.3	<i>Differenzierung der Ektoteloblasten</i>	64
4.5	Teilungsaktivität der Ektoteloblasten.....	69

4.6	Der mittlere Ektoteloblast	71
4.7	Begradigung des äußeren Halbkreises und die Zellen, die einen Teil der Mittellinie bilden	73
4.8	Ist die Reihe AB ektoteloblastischen Ursprungs?	74
4.9	Gemeinsamkeiten der Isopoden	76
4.10	Unabhängige Entwicklung der Körperseiten	78
4.11	Differenzierung bedingt Elongation	79
4.12	Einige Worte zum Begriff der Wachstumszone	80
5.	LITERATURVERZEICHNIS	83
6.	ANHANG	96
6.1	Datenanalyse mit FIJI (MaMuT)	96
6.2	Erklärungen zu den Aufnahmen	97
6.3	Zellteilungsmuster der Ektoteloblasten	100
6.4	Zellteilungsmuster in der Reihe AB	103
7.	DANKSAGUNG	104
8.	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	106

I. ZUSAMMENFASSUNG

Die Keimstreifverlängerung der Malacostraca wird durch ein festgelegtes Zellteilungsmuster der posterioren Teilungszone erreicht. Dort geben anfangs in einem Halbkreis angeordnete Ektoteloblasten ihre Tochterzellen nach anterior ab, welche das für malakostrake Krebse typische Gittermuster ausbilden. Dabei spielen die Ektoteloblasten eine besondere Rolle, da sie das Zellmaterial für die anschließende Segmentierung produzieren. Im Gegensatz zu Vertretern basal abzweigender Taxa der Malacostraca, bei denen sich der Halbkreis der Ektoteloblasten aus zwei Halbreihen oder aus einem Zellring bildet, sind bei den Isopoden, zu denen auch die Kellersassel *Porcellio scaber* zählt, die Ektoteloblasten von Beginn an in einem Halbkreis angeordnet. Das Teilungsmuster bei der Verlängerung des Keimstreifens wurde bereits bei vielen Vertretern der Malacostraca, einschließlich *P. scaber*, ausführlich untersucht. Daten über die Bildung der Ektoteloblasten und den Beginn ihrer Teilungsaktivität fehlen dagegen weitestgehend. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher mit Hilfe von Zellmarkierungsversuchen mit Vitalfarbstoffen (wie z.B. Alexa Fluor 488 und Tetramethylrhodamin) und der 4D-Mikroskopie die Bildung der Keimscheibe, die Gastrulation und der Beginn der Keimstreifverlängerung bei *P. scaber* untersucht. Ein besonderer Fokus lag dabei auf den Ektoteloblasten und den umliegenden Zellen, deren Zelllinien untersucht wurden. Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, sind (i) die Ektoteloblasten bereits vor Beginn der Gastrulation in einem äußeren Halbkreis formiert, (ii) zwei Zellen, die Teile der späteren Mittellinie bilden, bis kurz vor Beginn der Teilungstätigkeit der Ektoteloblasten in deren Reihe eingereiht, (iii) die Ektoteloblasten erst mit der Fertigstellung der ersten e-Reihe als große, verlängerte Zellen erkennbar und es ist (iv) ein zweiter Halbkreis vorhanden, der sich ausschließlich in posteriore Richtung teilt und dadurch den Gastrulationsporus schließt.

Stichwörter: Zellmarkierung
Ektoteloblast
Crustacea
4D-Mikroskopie

II. ABSTRACT

In malacostracan crustaceans, the elongation of the germ band is realized by an invariant cell division pattern of the posterior growth zone. The ectoteloblasts are arranged in a semicircle and divide in anterior direction in a fixed pattern. Their progeny are arranged in the typical grid pattern of malacostracan crustaceans and provide the cell material for later segmentation processes. In contrast to other malacostracans, where the ectoteloblast appear in two half rows or a cell ring, the ectoteloblasts are arranged in a semicircle in isopods from the outset. The cell division pattern during elongation of the germ band is well studied in many malacostracan species including the isopod *Porcellio scaber*. However, details about formation of the ectoteloblasts and beginning of their cell division activity are missing. Therefore, the aggregation of the germ disc, the gastrulation, and the beginning of the elongation of the germ band in *Porcellio scaber* were examined using vital dyes (e.g. Alexa Fluor 488 and Tetramethylrhodamine) in cell labeling experiments combined with 4D-microscopy. The formation and cell-lineages of the ectoteloblasts and their surrounding cells were analyzed. The results suggest that (i) the ectoteloblasts are arranged in a semicircle before gastrulation starts, (ii) two cells forming part of the arising midline are lined up with the ectoteloblasts until they start their cell division activity in a predetermined pattern, (iii) the differentiation of ectoteloblasts is discernable after formation of the first e-row when they appear as big and elongated cells and (iv) a second semicircle exists whose cells divide in posterior direction and, consequently, enclose the gastrulation pore.

Keywords: cell-labeling
ectoteloblast
Crustacea
4D-microscopy

III. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1: Versuchsaufbau für die Vitalfärbung.....	14
ABBILDUNG 2: Aufbau der 4D-Mikroskopie	15
ABBILDUNG 3: Nutzeroberfläche des PlugIns MaMuT in FIJI.....	17
ABBILDUNG 4: Anordnung der Ektoteloblasten und ihrer Tochterzellen	19
ABBILDUNG 5: Schema zur Teilungsaktivität der Ektoteloblasten	20
ABBILDUNG 6: Abbildung 16 aus Vehling, 1994	20
ABBILDUNG 7: Zusammenfassung aller Aufnahmen von <i>Porcellio scaber</i> in zeitlicher Korrelation zueinander.....	23
ABBILDUNG 8: Frühe Furchungen bis zur Keimscheibenbildung aus der Aufnahme 1	24
ABBILDUNG 9: Zellmembranbildung in der frühen Keimscheibe.....	25
ABBILDUNG 10: Zelldifferenzierung der späten Keimscheibe in Embryo A ...	28
ABBILDUNG 11: Gastrulation bei <i>Porcellio scaber</i>	30
ABBILDUNG 12: Veränderung der Halbkreise im Embryo A	33
ABBILDUNG 13: Teilungsmuster der Ektoteloblasten beider Körperseiten	38
ABBILDUNG 14: 3D Viewer Darstellungen dreier Embryonen im Vergleich...	49
ABBILDUNG 15: Teilungsaktivität der Zellen des inneren Halbkreises im Embryo A.....	51
ABBILDUNG 16: Zellzahl-Zeitverlaufs-Diagramm entsprechend der verschiedenen Zellschicksale für Embryo A	54
ABBILDUNG 17: Schematisierte Zellzahl-Zeitverlaufs-Diagramme für drei Embryonen im Vergleich	55
ABBILDUNG 18: Phylogenie der Malacostraca nach Schwentner et al. (2018)	57
ABBILDUNG 19: Schematische Darstellung der frühen Entwicklung bei der Kellersassel <i>Porcellio scaber</i>	58
ABBILDUNG 20: Frühe Keimscheiben der Isopoden <i>Jaera albifrons</i> und <i>Porcellio scaber</i>	78
ABBILDUNG A1: Teilungsmuster der Ektoteloblasten der linken Körperseite	101
ABBILDUNG A2: Teilungsmuster der Ektoteloblasten der rechten Körperseite	102
ABBILDUNG A3: Teilungsmuster der Reihe AB sowie der Reihen A und B beider Körperseiten aller Embryonen	103

IV. TABELLENVERZEICHNIS

TABELLE 1: Haltungsbedingungen für die Kellerrassel <i>Porcellio scaber</i>	11
TABELLE 2: Übersicht der verwendeten Vitalfarbstoffe.....	14
TABELLE 3: Anzahl der Ektoteloblasten im Verlauf der Entwicklung dreier Embryonen (A, B, C)	33
TABELLE 4: Teilungsreihenfolge der Ektoteloblasten dreier Embryonen (A, B, C).....	37
TABELLE 5: Teilungsabfolge der Ektoteloblasten und Beginn der mitotischen Teilungen bei den Embryonen Nummer 6 und 7	41
TABELLE 6: Dauer für die Bildung der ersten drei e-Reihen (el, ell, eIII)	42
TABELLE 7: Übersicht der Teilungsdauer (in Stunden) aller Ektoteloblasten von allen Embryonen (A-C und Nummer 1-8) mit Mittelwerten	43
TABELLE 8: Reihenfolge der Zellteilungen in den AB- bzw. A- und B- Reihen (unvollständig) bei den Embryonen A, B und C.....	47
TABELLE 9: Teilungsabfolge der Zellen der Reihe AB	48
TABELLE 10: Anzahl der Ektoteloblasten bei Isopoden vor der Gastrulation und final.....	69
TABELLE A1: Teilungsmuster der Ektoteloblasten aller Embryonen.....	100

V. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1x = einmal	Ex = Extinktion
A. dest = Aqua dest	FIJI = Fiji is just ImageJ
Abb. = Abbildung	fl = Vitalfarbstoff
ag = Agarose	H ₂ O = Wasser
ar = asselspezifische Ringerlösung	in = Injektionsnadel
Artikelnr. = Artikelnummer	MaMuT = Massive Multiview Tracker
bspw. = beispielsweise	Me = Mesoderm
bzw. = beziehungsweise	MEn = Mesentoderm
ca. = circa	Nr. = Nummer
d.h. = das heißt	ob = Objektiv
de = Deckel	ps = Petrischale
dg = Deckgläschen	S. = Seite
DMSO = Dimethylsulfoxid	sp. = species
e.g. = exempli gratia	syn. = Synonym
Ek = Ektoderm	t = Zeitpunkt
em = Embryo	Tab. = Tabelle
Em = Emission	TL = Teelöffel
En = Endoderm	vgl. = vergleiche
ET = Ektoteloblast	vs. = versus
ET _n = n-ter Ektoteloblast	z.B. = zum Beispiel

VI. EINHEITENVERZEICHNIS

% = Prozent

°C = Grad Celsius

µl = Mikroliter

cm = Zentimeter

h = Stunden

hPa = Hektopascal

mg = Milligramm

min = Minute

ml = Milliliter

mM = Millimolar

mmol/l = Millimol pro
Liter

mol/l = Mol pro Liter

nm = Nanometer

s = Sekunde

1. EINLEITUNG

1.1 Frühe Entwicklung der Arthropoden

Die Entwicklung der Arthropoda (Gliederfüßer), zu denen neben den Crustacea (Krebstiere) auch die Hexapoda (Sechsfüßer), Myriapoda (Tausendfüßer) und die Chelicerata (Kieferklauenträger) gehören, wurde schon umfassend untersucht. Dabei wurde vor allem die frühe Entwicklung von der befruchteten Zygote bis zur Bildung der Segmente und ihrer Anhängen (d.h. Antennen, Mundwerkzeuge und Beine) bei Vertretern mit unterschiedlichen Entwicklungsformen (direkt vs. indirekt; totaler vs. superfizieller Furchung) vergleichend betrachtet und unter evolutionären Aspekten diskutiert (Übersichtsartikel Scholtz und Wolff, 2013; Chipman, 2015; Jirikowski et al., 2015). Bei der direkten Entwicklung schlüpfen Juvenile, die bereits alle Merkmale des Adultus aufweisen (Chipman, 2015). Dem gegenüber treten bei der indirekten Entwicklung zwischen der Embryonalentwicklung und dem Adultstadium ein oder mehrere Larvenstadien (Larvalentwicklung) auf, die sich in ihren Merkmalen von den Adulten unterscheiden, z.B. eine Naupliuslarve mit drei Segmenten (Chipman, 2015). Innerhalb der Arthropoden wurden vor allem Vertreter der paraphyletischen Gruppe der ‚Crustacea‘ und der Hexapoda, wie z.B. die Modellorganismen *Drosophila melanogaster* (Diptera) oder *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera), die laut einer aktuellen molekulargenetischen Studie näher mit den Remipedia verwandt sind (Schwentner et al., 2018), umfassend untersucht (z.B. ‚Crustacea‘: McMurrich, 1895; Scholtz und Dohle, 1996; Dohle und Scholtz, 1997; Gerberding und Patel, 2004; *Drosophila melanogaster*: Mitchison und Sedat, 1983; Patel et al., 1989; Wolff et al., 1998; *Oncopeltus fasciatus*: Liu und Kaufman, 2004, 2005; Auman et al., 2017, 2018). Innerhalb der morphologisch vielgestaltigen Gruppe der Crustacea sind es wiederum die Malacostraca („Höhere Krebse“) deren Embryogenese bereits umfassend und detailliert untersucht wurde. Insbesondere für die Peracarida und Decapoda liegen

ausführliche Studien zur Bildung und Verlängerung des Keimstreifens vor (z.B. Dohle, 1970, 1972, 1976; Hahnenkamp, 1974; Fischer et al., 2010).

Während der ersten Entwicklungsstadien entsteht bei Arthropoden aus der befruchteten Zygote durch totale oder superfizielle (partielle) Furchung (oder eine Kombination aus beiden) ein einschichtiger Zellhaufen, die Keimscheibe. Bei der superfiziellen Furchung, wie sie z.B. bei den Isopoden (Crustacea, Malacostraca, Peracarida) auftritt, finden zunächst nur Kernteilungen statt, die Bildung der Zellmembranen erfolgt erst zu einem späteren Zeitpunkt der Entwicklung, wenn die Keimscheibe (Blastoderm genannt) geformt wurde und die Gastrulation beginnt. Während die Keimscheibe noch durch Zellteilungen wächst, beginnt die Gastrulation, bei der die drei Keimblätter Ekto-, Meso- und Entoderm „separiert“ und der Gastrulationsporus gebildet wird (Übersichtsartikel Scholtz und Wolff, 2013). So wie die oben genannten Entwicklungsformen variieren können, gibt es auch verschiedene Formen der Gastrulation bei den Gruppen der Arthropoden (Übersichtsartikel Weygoldt, 1960a). Am Ende der Gastrulation, wenn der Gastrulationsporus, also die Stelle, an der die Zellen des Ento- und Mesoderms unter das Blastoderm wandern, geschlossen ist, können erste Zelldifferenzierungen innerhalb der Keimscheibe beobachtet werden (z.B. Ōishi, 1959, 1960; Dohle, 1970; Fischer et al., 2010). Die Zelldifferenzierung findet in Folge einer Veränderung des Zusammenspiels von Gap-Genen, Pair-Rule-Genen, Segment-Polaritätsgenen und Hox-Genen (regulatorisches Netzwerk) statt. Die daraus resultierenden Genaktivitäten und -gradienten beeinflussen die Determinierung (Festlegung der Zellschicksale) und Segmentierung (z.B. Averof und Patel, 1997; Abzhanov und Kaufman, 2000; Copf et al., 2003, 2004; Chipman und Akam, 2008; Chipman, 2015). Die einzelnen Genaktivitäten wurden mit Hilfe von diversen Genexpressionsmusteranalysen und „knock-down-Versuchen“ umfassend untersucht. Diese Methoden wurden in der Entwicklungsbiologie bereits etabliert (z.B. Patel, 1994; Damen et al., 2000; Shinmyo et al., 2006; Auman et al., 2017).

Nach der Gastrulation verlängert sich die Keimscheibe, die nun zumeist aus allen drei Keimblättern besteht, bei allen Gruppen der

Crustacea durch Zellwanderung und -teilung zu einem Keimstreifen (Keimstreifverlängerung; Übersichtsartikel Scholtz und Wolff, 2013). Bei den Malacostraca wird dies durch die Teilungsaktivität der Teloblasten (Ekto- und Mesoteloblasten) realisiert (Dohle et al., 2004). An der Verlängerung des Keimstreifens sind bei den Vertretern der Malacostraca nicht nur die Teloblasten und deren Abkömmlinge (e-Reihen) beteiligt. Auch Zellen nicht-teloblastischen Ursprungs, wie die Zellen der Reihen A und B (E-Reihen), die sich anterior der e-Reihen ebenfalls in Zellreihen und -säulen anordnen, sind an der Bildung des Gittermusters beteiligt (Dohle und Scholtz, 1988; Scholtz, 1990, 2000; Wolff und Scholtz, 2002). Der Keimstreif liegt auf dem Dotter auf und markiert die künftige Bauchseite (Ventralseite) des Embryos. Die Länge des Keimstreifens variiert bei den verschiedenen Taxa der Arthropoden. Dabei kann zwischen einem kurzen (short germ band; z.B. beim Grashüpfer *Schistocerca gregaria* (Orthoptera, Hexapoda)), intermediären (intermediate germ band; z.B. bei der Kellerassel *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea)) und langen Keimstreifen (long germ band; z.B. bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* (Diptera, Hexapoda)) unterschieden werden (Dearden und Akam, 2001; Peel und Akam, 2003; Liu und Kaufman, 2005; Übersichtsartikel Peel et al., 2005; Übersichtsartikel Scholtz und Wolff, 2013).

1.2 Frühe Entwicklung der Malacostraca

Die Verlängerung des Keimstreifens erfolgt im Grundmuster der Malacostraca durch die Teilungsaktivität von 19 Ektoteloblasten und acht Mesoteloblasten (Dohle, 1972; Dohle und Scholtz, 1988, 1997; Scholtz und Dohle, 1996; Scholtz, 2000; Dohle et al., 2004). Diese sind paarig in einem Halbkreis im posterioren Bereich des Embryos am Gastrulationszentrum angeordnet. Die Ektoteloblasten werden durch einen unpaaren mittleren Ektoteloblasten (ET₀) ergänzt, der im weiteren Verlauf der Embryogenese vor sich die Zellen der Mittellinie bilden wird (Gerberding, 1999; Gerberding und Scholtz, 1999; Hejnol, 2002; Hejnol et

al., 2006). Durch ihre charakteristische Teilungstätigkeit bilden sie die e-Reihen und damit das für die Malacostraca typische Gittermuster aus, indem sich deren Abkömmlinge in Reihen und Säulen anordnen (Dohle et al., 2004). Im Allgemeinen sind Teloblasten (also Ekto- und Mesoteloblasten) als langgestreckte, großkernige Zellen identifizierbar, die durch inäquale Teilung in anteriore Richtung eine festgelegte Anzahl an kleineren Tochterzellen abgeben (Siewing 1969; Stent, 1985; Dohle und Scholtz, 1997; Dohle et al., 2004). Bei fast allen Malacostraca werden Ekto- und Mesoteloblasten in zwei Phasen gebildet (Dohle, 1970). Bevor sie sich differenzieren, sprich ihre typischen Merkmale (siehe oben) ausbilden, sind sie schon als solche festgelegt (determiniert) und können folglich als Zelllinie dargestellt werden. Eine Zelllinie beschreibt dabei Zellen, die sich in einem festgelegten Muster teilen und deren Zellteilungen und Differenzierung deshalb vorhersagbar ist (Gerberding, 1999; Hejnol, 2002; Dohle et al., 2004). Rekonstruierte Zelllinien können in Zelllinien-Stammbäumen dargestellt werden und so zum Verständnis des Teilungs- und Wanderungsverhalten bestimmter Zelltypen vor und während bedeutender Entwicklungsprozesse, wie z.B. der Gastrulation (Differenzierung der Keimblätter), beitragen (Gerberding und Patel, 2004).

Ektoteloblasten sind innerhalb der Malacostraca bei den Leptostraca, Stomatopoda, Decapoda, Syncarida und Peracarida beschrieben (Manton, 1928, 1934; Hickman, 1937; Nair, 1941, 1948; Shiino, 1942; Ōishi, 1959, 1960; Hahnenkamp, 1974; Scheidegger, 1976; Zilch, 1978; Scholtz, 1992; Gerberding, 1999; Hejnol, 2002; Hertzler, 2002; Scholtz und Kawai, 2002; Scholtz und Wolff, 2002; Fischer et al., 2010). Bei den Peracarida basiert die Keimstreifverlängerung nur bei den Mysidacea (*Hemimysis lamorae*, Manton, 1928; *Mesopodopsis orientalis*, Nair, 1939; *Neomysis integer*, Scholtz, 1984), den Cumacea (*Diastylis rathkei*, Dohle, 1970, 1976), den Tanaidacea (Scholl, 1963; *Leptochelia* sp., Dohle, 1972) und den Isopoda (*Asellus aquaticus*, *Ligia oceanica*, Hahnenkamp, 1974; *Porcellio scaber*, Vehling, 1994) auf Ektoteloblasten, während Amphipoda (Scholtz, 2000; *Gammarus pulex*, Bergh, 1892; Scholtz, 1990; *Cryptorchestia cavimana* syn. *Orchestia cavimana*, Hejnol, 2002; Scholtz und Wolff, 2002; *Parhyale hawaiiensis*, Gerberding et al., 2002) keine

Ektoteloblasten besitzen. Bei ihnen wird die Verlängerung des Keimstreifens vor allem durch die Anordnung ektodermaler Zellen in Reihen und Säulen realisiert (Scholtz, 1990; Hejnol, 2002; Wolff und Scholtz, 2002). Zumeist entstehen die Ektoteloblasten der Malacostraca durch die Differenzierung von Blastodermzellen und nur selten durch die Teilung gemeinsamer Vorläuferzellen (Dohle, 1970; Strömberg, 1972). Letzteres wurde lediglich für die Dekapoden *Hemigrapsus sanguineus* (Brachyura), *Heptacarpus rectirostris* (Caridea) und *Pagurus samuelis* (Anomura) (Ōishi, 1959, 1960) beschrieben, bei denen die Ektoteloblasten aus vier Paar großen Vorläuferzellen (E1, II, III und IV genannt) entstehen. Bei den Peracarida variiert die Anzahl der Ektoteloblasten zwischen den verschiedenen Taxa, den Individuen einer Art und beiden Körperseiten eines Embryos (z.B. McMurrich, 1895; Strömberg, 1972; Übersichtsartikel Anderson, 1973; Dohle und Scholtz, 1997). So sind bei den Cumacea 21 bis 25 Ektoteloblasten für *Diastylis rathkei* (Dohle, 1970), bei den Mysidacea 15 bis 21 für *Hemimysis lamorae* (Manton, 1928), 14 bis 16 für *Mesopodopsis orientalis* (Nair, 1939), 17 bis 21 für *Neomysis integer* (Scholtz, 1984), bei den Tanaidacea 19 bis 23 für *Leptochelia* sp. (Dohle, 1972) und bei den Isopoden 21 bis 25 für *Asellus aquaticus* (Hahnenkamp, 1974), *Jaera marina* (McMurrich, 1895), *Idotea granulosa* (Strömberg, 1965) und *Idotea neglecta* (Strömberg, 1965) bzw. 20 bis 28 Ektoteloblasten für *Ligia oceanica* (Hahnenkamp, 1974) beschrieben. Außerdem sind bei allen Taxa der Peracarida die Ektoteloblasten stets in einer transversalen Reihe angeordnet (Dohle und Scholtz, 1997). Im Gegensatz dazu sind die Anzahl (vier Paar) und Anordnung der Mesoteloblasten in einer Reihe posterior zur Reihe der Ektoteloblasten innerhalb der Malacostraca stark konserviert (Dohle und Scholtz, 1997).

Eine zentrale Frage entwicklungsbiologischer Arbeiten an Vertretern der Malacostraca bezieht sich auf die Zeitpunkte der Determinierung und Differenzierung der Ektoteloblasten (Dohle, 1970), wobei der Begriff der Differenzierung nicht ganz klar abgegrenzt ist. Zur Differenzierung eines Ektoteloblasten zählen bspw. seine zellmorphologische Veränderung zu einer großen Zelle mit großem Zellkern, sowie ein festgelegtes Teilungsverhalten (inäquale Teilung in anteriore Richtung) (Siewing 1969;

Stent, 1985; Dohle und Scholtz, 1997; Dohle et al., 2004). Jedoch sind vor allem die Beschreibungen zur Differenzierung der Ektoteloblasten trivial und oftmals nur auf die Angabe des Zeitpunktes begrenzt, ab wann Ektoteloblasten zellmorphologisch erkennbar sind oder ab wann sie mit ihrer Teilungstätigkeit beginnen (zusammen differenziert *sensu* Dohle, 1970). Diesen Angaben zufolge sind die Ektoteloblasten bei den Malacostraca in der Regel erst nach dem Ende der Gastrulation zellmorphologisch als solche erkennbar, wobei sie mit ihrer Teilungstätigkeit zu unterschiedlichen Zeitpunkten beginnen. Nur bei den Dekapoden *Eupagurus prideauxi* (Anomura), *Hemigrapsus sanguineus* (Brachyura), *Heptacarpus rectirostris* (Caridea) und *Pagurus samuelis* (Anomura) sollen schon vor Beginn der Gastrulation einige der Ektoteloblasten zellmorphologisch erkennbar sein (Ōishi, 1959, 1960; Scheidegger, 1976), jedoch fehlen genauere Angaben zur Determinierung der Ektoteloblasten.

1.3 Teloblastenbildung bei Isopoden

Innerhalb der Isopoda wird die Verlängerung des Keimstreifens wie bei anderen Malacostraca vor allem durch die Teilungsaktivität der Ekto- und Mesoteloblasten realisiert. Die 19 bis 23 Ektoteloblasten sind anterior des Gastrulationszentrums in einem Halbkreis angeordnet, der im weiteren Verlauf der Embryogenese zu einer Geraden wird (z.B. Hahnenkamp, 1974; Vehling, 1994). Die Ektoteloblasten teilen sich genau zwölfmal inäqual und dann noch ein weiteres Mal äqual, sodass sie insgesamt 14 e-Reihen bilden. Auch bei den verschiedenen Vertretern der Isopoda wurde eine schwankende Anzahl von Ektoteloblasten beschrieben (Hahnenkamp, 1974). Während die verschiedenen Stadien bei der Entwicklung der Kellerrassel *Porcellio scaber* bereits ausführlich morphologisch beschrieben wurden (Reinhard, 1887; Roule, 1891; Wolff, 2009; Milatović, 2010) und zahlreiche Studien sich mit der Verlängerung des Keimstreifens beschäftigt haben (McMurrich, 1895; Hahnenkamp, 1974; Vehling, 1994; Hejnal, 2002), fehlen Informationen über

Zellteilungen und Zellwanderungen während der Keimscheibenbildung und der Gastrulation. Erste Kernfärbungen bei *Porcellio scaber* haben gezeigt, dass die Ektoteloblasten mit Ende der Gastrulation zellmorphologisch als solche erkennbar sind (Vehling, 1994; Wolff, 2009), doch fehlen noch weitestgehend genaue Angaben dazu, ab wann ein Ektoteloblast determiniert ist.

1.4 Methoden in der Entwicklungsbiologie

Zellmarkierungen mittels Vitalfarbstoffen sind nicht nur ein modernes Werkzeug der Entwicklungsbiologie zur Untersuchung von Zelllinien, sondern ermöglichen auch die spezifische Markierung von Zellbestandteilen, wie z.B. der Zellmembran, des Zellkerns und des Zelllumens, sodass sie auch zur Untersuchung weiterer Entwicklungsprozesse, wie z.B. der Bildung von Zellmembranen, genutzt werden können. Die Vitalfarbstoffe können jederzeit injiziert werden und werden dann über Zellteilungen an die Tochterzellen weitergegeben, ohne dabei die Weiterentwicklung des Embryos zu beeinträchtigen. Bisher wurde diese Methode innerhalb der Krebstiere nur bei Amphipoden angewandt (Gerberding, 1999; Gerberding und Scholtz, 1999; Gerberding et al., 2002; Scholtz und Wolff, 2002), bei *Porcellio scaber* hingegen wurde noch nie die frühe Embryogenese unter Verwendung eines Vitalfarbstoffes untersucht.

In ihren Anfängen wurde die 4D-Mikroskopie nur am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* (Nematoda) angewendet. Mit ihrer Hilfe und unter Nutzung neuartiger Analyseprogramme konnten Erkenntnisse über Zellteilungsmuster und Zellwanderung bei *Caenorhabditis elegans* erzielt werden (Schnabel et al., 1997). Dies stellt ein Meilenstein in der Entwicklungsbiologie dar und wurde seither als vielseitig einsetzbares Werkzeug in dieser etabliert und weiterentwickelt (Schnabel et al., 1997; Hejnal et al., 2006; Wolff et al., 2018). Die 4D-Mikroskopie erlaubt die Dokumentation räumlicher und zeitlicher Komponenten von Entwicklungsprozessen, die in sogenannten Zeitraffern festgehalten

werden (Wiedergabe ausgewählter Zeitpunkte aus einer Langzeitaufzeichnung; Hird und White, 1993), welche eine nachträgliche Analyse der Entwicklung unter Beachtung zeitlicher und räumlicher Faktoren ermöglichen. Durch die Dokumentation von Zellteilungen, Zellwanderungen und Größenveränderungen können so exakte Zelllinien rekonstruiert und Zellcharakteristika definiert werden.

1.5 Zielstellung der Dissertation

Die Kellerrassel *Porcellio scaber* ist ein zugänglicher und gut handhabbarer Vertreter der Isopoda, dessen Ektoteloblasten aufgrund der halbkreisförmigen Anordnung gut erkennbar sind (Nair, 1956; Strömberg, 1971, 1972; Hahnenkamp, 1974) und deren Zelllinie daher vergleichsweise einfach analysiert werden kann. Mit der Untersuchung, wie die Keimscheibe und das Gittermuster bei *Porcellio scaber* gebildet werden, sollen erste Einblicke in die frühe Entwicklung des Perakariden geliefert werden, um bestehende Lücken zu schließen und eine Grundlage für weiterführende und vergleichende Arbeiten zu liefern. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen unter Anwendung von Vitalfarbstoffen und der 4D-Mikroskopie die bisherigen Kenntnisse zur Bildung der Ektoteloblasten bei *Porcellio scaber* überprüft und erweitert werden. Dabei hat die vorliegende Arbeit die Beantwortung folgender zentraler Fragestellungen zum Ziel:

- Wie bilden sich die Ektoteloblasten bei *Porcellio scaber*?
- Entstehen die Ektoteloblasten durch Differenzierung aus zwei verschiedenen Zellen, die nur eine gemeinsame Zygote gemein haben, oder aus Tochterzellen einer gemeinsamen Vorläuferzelle?
- Ab wann sind die Ektoteloblasten als solche festgelegt (determiniert) und ab wann sind sie zellmorphologisch erkennbar?

- Wie verlaufen die Gastrulation, der Schluss des Gastrulationsporus und die Keimstreifverlängerung?
- Wie sind diese Prozesse miteinander verknüpft und synchronisiert?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Tierhaltung

Es wurde eine Zucht von der Kellerrassel *Porcellio scaber* aus Beständen der Arbeitsgruppe Vergleichende Zoologie der Humboldt-Universität zu Berlin unter Prof. Dr. Gerhard Scholtz und von Tieren aus dem Freiland zusammengestellt. Die Tiere wurden im Garten des Instituts für Biologie und in Wäldern mit hohem Totholzanteil sowie hoher Luftfeuchtigkeit gesammelt.

Die Haltung der Tiere erfolgte in Gefäßen mit Totholz und Rindenstückchen bei konstanter Luftfeuchtigkeit (detaillierte Haltungsbedingungen in TABELLE 1). Neben einer Hauptzucht wurden auch mehrere kleine Zuchtgefäße angelegt. Zur Fütterung wurden Gurken, Karotten und getrocknetes Eichenlaub sowie ein spezielles Asselfutter aus dem Onlinehandel (Terra-Jungle Onlineshop, TJ Asselfutter, 550 ml, Artikelnr.: 0101) verwendet.

Für nachfolgende Untersuchungen wurden die Embryonen verwendet. Eine stark erhöhte Reproduktion fand in den Monaten März und Oktober statt, sodass in diesen Monaten die meisten Embryonen gesammelt werden konnten.

TABELLE 1: Haltungsbedingungen für die Kellerrassel *Porcellio scaber*.

Größe der Zuchtgefäße	<ul style="list-style-type: none"> • Durchmesser 30 Zentimeter
Ausstattung der Gefäße	<ul style="list-style-type: none"> • blickdichte Gefäße, z.B. schadstofffreie, handelsübliche Schüsseln • bis zu zehn Zentimeter hohe Schicht aus handelsüblicher Blumenerde (unspezifisch) • getrocknete, unbehandelte Eichenblätter und verschiedenen lange Rindenstücke von Kiefer oder Korkeiche • eine transparente Platte, mit sechs Löchern, als Deckel (Verdunstungsschutz, Erhalt der Luftzirkulation)
Anzahl der Tiere je Gefäß	<ul style="list-style-type: none"> • Hauptzucht: 30 bis 150 Individuen pro Gefäß • Zucht für Experiment: bis zu 20 Tiere, davon 25 % Männchen und 75 % Weibchen
Raumtemperatur	<ul style="list-style-type: none"> • durchschnittlich 25 °C (zwischen 23 °C und 26,5 °C)
Luftfeuchtigkeit	<ul style="list-style-type: none"> • stets feuchten, nicht nassen Bodengrund • täglich überprüft • 1x wöchentlich befeuchten
Lichtzyklus	<ul style="list-style-type: none"> • Standort ohne direkte Sonneneinstrahlung • Tag-Nacht-Rhythmus: 13 h Licht, 11 h dunkel
Fütterung	<ul style="list-style-type: none"> • 1x wöchentlich (Menge für Hauptzucht): <ul style="list-style-type: none"> + 3-4 Scheiben Möhre (ca. 1 cm dick) + 1 Scheibe Gurke (ca. 1 cm dick) + ca. 1 TL Asselfutter (Terra-Jungle)

2.2 Gewinnung der Embryonen

Zur Gewinnung der Embryonen wurden die eiertragenden Weibchen separiert, die anhand einer bauchseitigen Bruttasche (Marsupium) zu erkennen sind. Das Marsupium wird während der Häutung der Weibchen auf der Ventralseite (Bauchseite) zwischen den Laufbeinen aus speziellen Beinhängen (Oostegite) gebildet. Die Farbe der Eier wurde unter einem Stemi 2000-C Stereomikroskop von Zeiss begutachtet. Wenn die Eier grünlich bis gelb gefärbt waren oder sogar schon ein roter Augenfleck des Embryos zu erkennen war, wurden die Weibchen wieder in das Hauptzuchtgefäß gesetzt. Wenn die Eier hingegen gelbbraunlich gefärbt waren, wurde das Weibchen in Kohlenstoffdioxid-haltigen Wasser für weniger als eine Minute leicht sediert. Mit einer Federstahlpinzette wurde das Weibchen auf dem Rücken liegend fixiert und in einem Blockschälchen in Ringerlösung für Asseln (modifiziert nach Sutton, 1972: 0,200 mol/l NaCl; 0,022 mol/l KCl; 0,015 mol/l CaCl₂; 0,017 mol/l MgCl₂;

2,400 mmol/l NaCO_3 in A. dest.; gefiltert und bis zu mehreren Wochen bei 4 °C gelagert) eingetaucht, bis die bauchseitige Bruttasche vollständig von der Lösung bedeckt wurde. Mit einer Glaspipette wurden die Embryonen von der hinteren (posterioren) Öffnung des Marsupiums aus vorsichtig herausgespült und in ein weiteres Blockschälchen mit frischer Ringerlösung, die mit dem Antibiotikum Penicillin/Streptomycin-Premix (in A. dest; 1:100; Carl Roth, Artikelnr.: HP10.1) und dem Antimykotikum Gibco™ Fungizone® Amphotericin B in A. dest (1:100; life technologies™, Artikelnr.: 15290-026) versetzt wurde, übertragen. Mit Hilfe des Antibiotikums und -mykotikums konnte ein Bakterien- und Pilzwachstum im Medium und auf den Embryonen über einen längeren Zeitraum vermieden werden, was Untersuchungen über die Dauer von mindestens einer Woche ermöglichte.

2.3 Vorbereitung für Vitalfärbungen

2.3.1 Präparation der Embryonen

Für die Vitalfärbung wurden Embryonen im Entwicklungsstadium S3, gemäß der Einteilung der Entwicklungsstadien bei Kellerasseln nach Wolff (2009), verwendet. Zur Bestimmung des genauen Entwicklungsstadiums der transparenten Embryonen der Kellerassel wurden aus jedem Gelege exemplarisch Individuen für maximal zwei Minuten in Hoechst 33342 (10 mg/ml in DMSO; 1:1000 in Ringerlösung; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Artikelnr.: 14533) inkubiert und als Kontrollgruppe verwendet, sodass anhand der gefärbten Zellkerne das exakte Entwicklungsstadium stets bestimmt werden konnte.

2.3.2 Vitalfärbung und Montage

In Vorbereitung der Vitalfärbung wurden Petrischalen mit 2 %iger Agarose ausgegossen und eine Rinne ausgeschnitten (ABBILDUNG 1).

Für die Injektion der Vitalfarbstoffe (TABELLE 2) wurden die Gelrinnen mit Ringerlösung gefüllt und die Embryonen unter einem Leica EZ4D von Leica Microscopy Systems darin aufgereiht. Als Vitalfarbstoffe wurden zwei Dextrane, Alexa 488 und Tetramethylrhodamin, verwendet. Beide färben das Zytoplasma der Zellen und werden auf diese Weise auch an Tochterzellen weitergegeben, die dann ebenfalls markiert sind. Für die Injektion wurde ein Mikroinjektor FemtoJet 5247 von Eppendorf (ausgestattet mit einem Fußtaster und einem zwei Meter langen Injektionsschlauch mit Universalkapillarenhalter), kombiniert mit einem Mikromanipulator MMN-1 (Narishige, Japan, Seriennummer 96314) und einer sterilen Injektionsnadel (Femtotip II; Eppendorf, Artikelnr.: 5242957000), verwendet. Der jeweilige Vitalfarbstoff wurde mit einem Druck von 10 bis 50 hPa für 0,1 bis 1 Sekunden injiziert, bis ein kleiner Fleck im Zentrum des Dotters erkennbar wurde, jedoch ohne das Ei zum Platzen zu bringen. Ein bis zwei Stunden nach der Injektion wurden die Embryonen in frische Ringerlösung übertragen. Mit Hilfe eines Fluoreszenzstereomikroskops Lumar.V12 SteREO, ausgestattet mit einer AxioCam MRm Kamera an einem 0,63 Kameraadapter und betrieben mit der Software AxioVision 4.0 Version 4.8.2.0 von Zeiss, wurde der Injektionserfolg sowie die Vitalität der Embryonen beurteilt. Für die 4D-Mikroskopie wurden nur Embryonen ausgewählt, in denen sich der Farbstoff gleichmäßig verteilt hatte. Das Ei wurden dann mit dem sich entwickelnden Embryo nach oben in 25-30 µl Agarose (1 %igen Agarose in Ringerlösung), in einem Kammersystem mit Deckgläschen und mit Ringerlösung gefüllt, eingebettet (ABBILDUNG 2 A). Das Auftragen von Vaseline (Carl Roth, Artikelnr.: E746.1) zwischen Deckel und Bodengefäß des Kammersystems verringert die Verdunstung der Ringerlösung und verhindert somit ein Austrocknen.

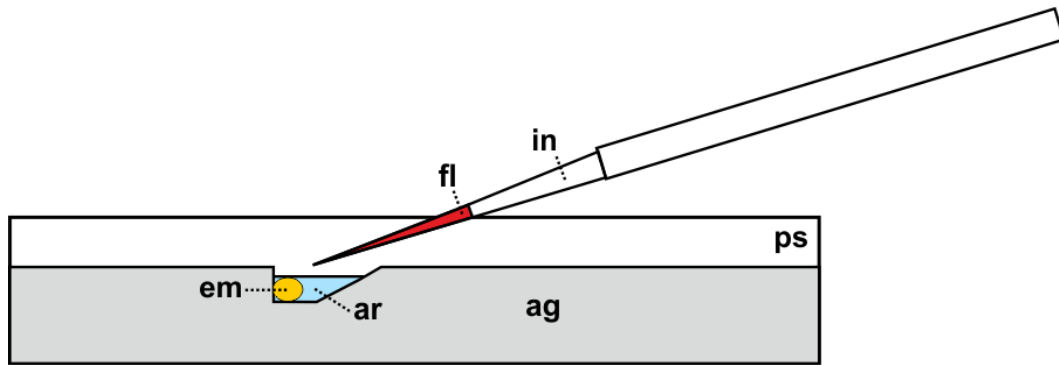


ABBILDUNG 1: Versuchsaufbau für die Vitalfärbung. Eine Petrischale (ps) wurde mit 2 %iger Agarose (ag) ausgegossen und eine Rinne mit dem Skalpell ausgeschnitten. Dort wurden dann die Embryonen (em), in Asselringer (ar) schwimmend, mit Hilfe einer Injektionsnadel (in) mit einem Vitalfarbstoff (fl) markiert. **TABELLE 2: Übersicht der verwendeten Vitalfarbstoffe.** Ex – Extinktion (angeregtes Licht), Em – Emission (abgegebenes Licht).

Vitalfarbstoff	Stammlösung	Wellenlänge	Hersteller	Artikelnr.
Dextran Tetramethylrhodamin	25 mM in RNasefreiem H ₂ O	Ex: 555 nm Em: 580 nm	Invitrogen™, Molecular Probes™	D3312
Dextran AlexaFluor™ 488	5 mM in RNasefreiem H ₂ O	Ex: 495 nm Em: 519 nm	Invitrogen™, Molecular Probes™	D22910

Die Embryonalentwicklung der Kellersassel (*Porcellio scaber*) beginnt im dotterreichen Ei mit einer superfiziellen, intralecithalen Furchung (Hejnal, 2002; Wolff, 2009; Milatović et al., 2010). Dabei teilt sich nur der im bräunlichen, grünlichen oder leicht gelblichen Dotter gelegene Zellkern (Wolff, 2009). Es folgen vier weitere synchrone und schräg zueinander verlaufende Teilungen bis zum 32-Kern-Stadium (Wolff, 2009), in denen jedoch noch keine Zellmembranen ausgebildet werden. Die Zellmarkierungen früherer Stadien (S1 und S2) führen zu einer Todesrate von einhundert Prozent. Die Injektion von Vitalfarbstoffen in ein S3-Stadium verläuft hingegen erfolgreich, obwohl die Gefahr besteht, dass wichtige Prozesse während der Keimscheibenbildung und Gastrulation gestört werden. Da die Zellmembranen im S3-Stadium im Verlauf der Bildung der Keimscheibe gebildet werden, ist das Zeitfenster für eine erfolgreiche Markierung intakter Embryonen (*whole-mounts*) mit Vitalfarbstoffen nur sehr klein und muss genauestens abgepasst werden.

2.3.3 4D-Mikroskopie

Der Versuchsaufbau für die 4D-Mikroskopie setzt sich aus einem Axioplan 2 Imaging-Mikroskop von Zeiss, ausgestattet mit einer pro.pixelfly Kamera (PCO AG) auf einem TV2/3“C 0,63x Kameraadapter, einer HXP 120 Kompaktlichtquelle (Leistungselektronik JENA GmbH) und einem computergesteuerten Objektisch zusammen, betrieben mit der Software „4D Microscop Version PixelflyUSB Berlin“ von Ralf Schnabel. Es wurde das Plan-APOCHROMAT Objektiv mit 10facher Vergrößerung von Zeiss (10x/0,45 und ∞ /0,17) zusammen mit einer Optovar-Vergrößerungseinheit (Zeiss, mit 1,60-2,30facher Vergrößerung) verwendet, die in die Vertiefung des Montageaufbaus passt (ABBILDUNG 2 B). Dabei bewegt der Computer den Objektisch und damit den Embryo in der Z-Ebene (Tiefe) (Hird und White, 1993). Eine über das Programm angesteuerte, motorische Blende regelt die Belichtung der Probe und schirmt diese zwischen den Aufnahmen vom Fluoreszenzlicht ab, wodurch eine fototoxische Wirkung des Fluoreszenzlichts und ein Ausbleichen des Farbstoffs verringert wird (Hejnos, 2002). Alle 15, 30, 60 oder 120 Minuten wurden Bildstapel aus jeweils 25, 35 oder 40 Einzelbildern aufgenommen. Die Dokumentation erfolgte im Dunkeln bei konstanten 20 °C Raumtemperatur.

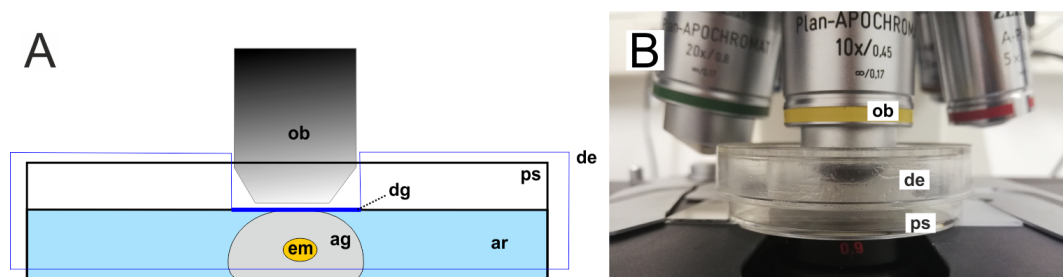


ABBILDUNG 2: Aufbau der 4D-Mikroskopie. **A:** Schematische Darstellung der Montage bei der 4D-Mikroskopie; **B:** Realer Versuchsaufbau mit 10x Objektiv. Abkürzungen: ag = Agarose, ar = asselspezifische Ringerlösung, de = Deckel, dg = Deckgläschen, em = Embryo, ob = Objektiv, ps = Petrischale.

2.3.4 Datenanalyse mit FIJI (MaMuT)

Die erhaltenen 4D-Datensätze wurden mit Hilfe der Software ACDSsee v3.1 (ACD Systems) in einen Bildstapel im TIFF-Format konvertiert, um sie als Hyperstack in der Software FIJI (Schindelin et al., 2012) öffnen zu können. Für jeden aufgenommenen Zeitpunkt wurde eine neue Datei mit allen Fokusebenen angefertigt, die zusammengefasst im HDF5/XML-Format gespeichert wurde (nach Pietzsch et al., 2015, Tinevez et al., 2017, 2018; detaillierte Anleitung siehe KAPITEL 6.1). Mit Hilfe des FIJI PlugIns MaMuT (Massive Multi-view Tracker) wurden anschließend die einzelnen Zellen manuell oder halbautomatisch in ihrer jeweiligen Fokusebene markiert (ABBILDUNG 3 A) und ihnen eine Farbe zugewiesen. In einer vereinfachten Darstellung der einzelnen Zellen als Kugeln im 3D Viewer (ABBILDUNG 3 B) mit gleicher Farbmarkierung konnten die Position und das Teilungsverhalten über den Zeitverlauf in einem Zelllinien-Stammbaum analysiert werden (Wolff et al., 2018; ABBILDUNG 3 C). Im Zelllinienstammbaum in ABBILDUNG 3 C repräsentiert jede Zeile einen Zeitpunkt der Aufnahme und jede Spalte einen „Track“ (Gesamtheit aller Abkömmlinge einer Zelle). Jeder Punkt steht für eine markierte Zelle, deren Abkömmlinge durch Linien miteinander verbunden sind. Über die Analyse aller markierten Zellen im zeitlichen Verlauf der Entwicklung kann eine Zelllinie erstellt und die Zellen entsprechend ihres späteren Zellschicksals farblich codiert werden. Alle analysierten Zelllinien des entsprechenden Embryos sind im linken Fenster gezeigt und die vergrößerte Darstellung eines kleineren Ausschnitts (blau umrahmt) im rechten Fenster (ABBILDUNG 3 C).

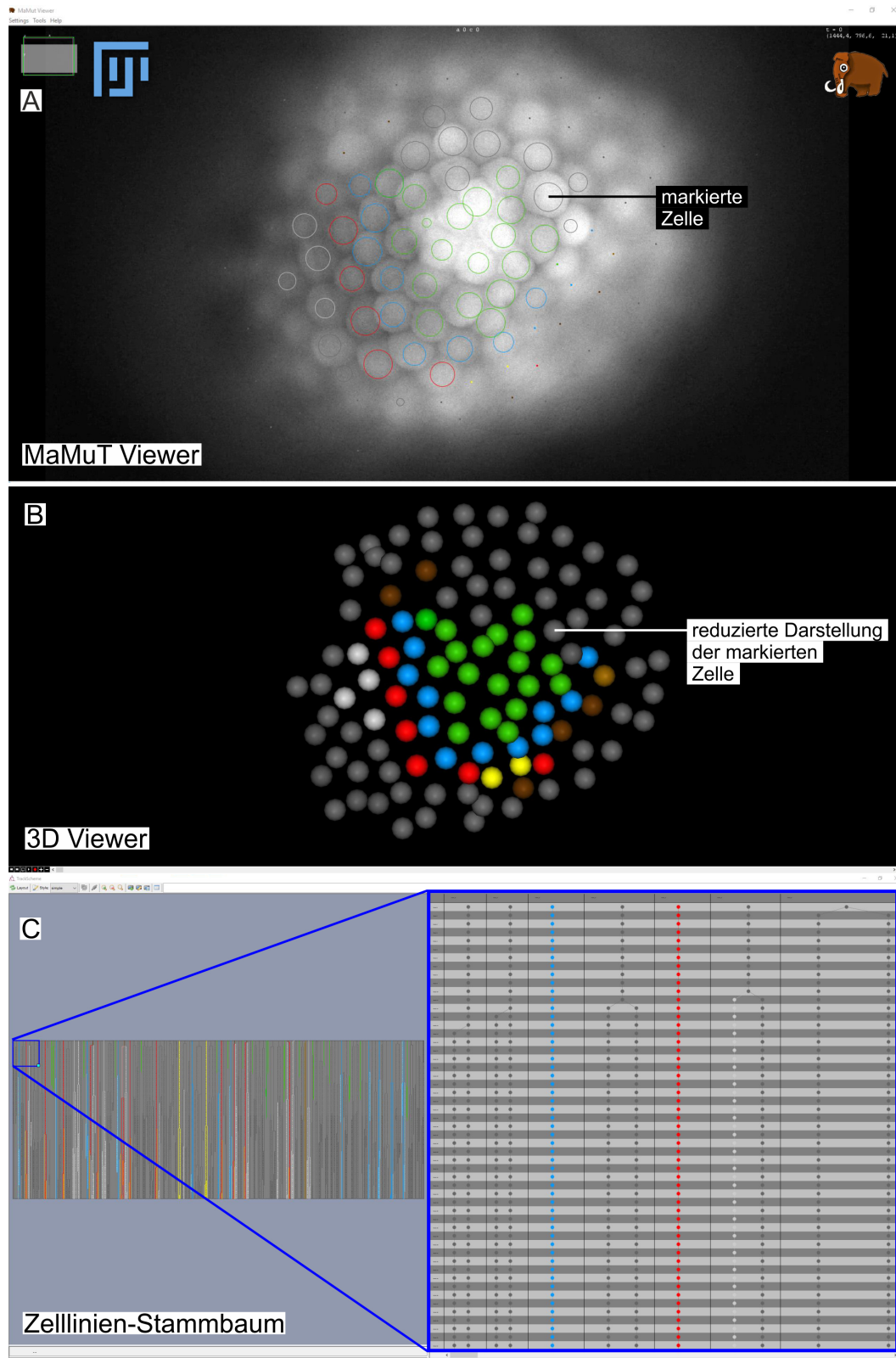


ABBILDUNG 3: Nutzeroberfläche des Plugins MaMuT in FIJI. A: MaMuT Viewer mit farblich markierten Zellen in den Originaldaten; **B:** Reduzierte Darstellung der markierten Zellen im MaMuT 3D Viewer; **C:** Fertiger Zelllinien-Stammbaum. Links sind alle Zelllinien des Embryos dargestellt und rechts ist eine vergrößerte Darstellung des blau markierten Bereichs zu sehen.

2.4 Terminologie

Die Zellen wurden entsprechend der Arbeiten von Dohle (1970, 1972, 1976), Scholtz (1990) und Vehling (1994) wie folgt benannt:

ET = Ektoteloblasten, erkennbar als große längliche Zellen, die in einem stereotypen Zellteilungsmuster eine definierte Anzahl an Tochterzellen in anteriore Richtung abgeben und sich inäqual teilen. Die Ektoteloblasten teilen sich insgesamt zwölfmal inäqual und bilden so zwölf kleinere Tochterzellen. In einer äqualen 13. Teilung entstehen dann zwei gleichgroße Derivate und der Ektoteloblast ist als solcher nicht mehr zu erkennen. Die 14 Tochterzellen der e-Reihen teilen sich nun zweimal mitotisch. Sie ordnen sich dann in Reihen und Säulen an und bilden so ein Gittermuster, da jeder Abkömmling vor dem entsprechenden Ektoteloblasten verbleibt (ABBILDUNG 4). Ein mittlerer, unpaarer Ektoteloblast, der etwas nach posterior verlagert liegt und als ET_0 bezeichnet wird (vgl. ABBILDUNG 4), bildet im Laufe der Embryogenese zusammen mit seinen Abkömmlingen die ventrale Mittellinie aus. Von ihm aus werden auf beiden Körperseiten ET_1 bis ET_n durchnummeriert.

e-Reihen = Zellreihen aus Derivaten der Ektoteloblasten, die von den Ektoteloblasten sukzessive gebildet und mit römischen Ziffern bezeichnet werden (eI, eII, eIII usw. bis voraussichtlich eXII). Anhand dieser werden die Entwicklungsstadien der Keimstreifverlängerung bezeichnet. Dementsprechend bedeutet eIII (3+3), dass die Ektoteloblasten mit der Bildung der dritten Zellreihe begonnen haben und diese bereits aus drei Zellen auf jeder Körperseite besteht (ABBILDUNG 6 zeigt Abbildung 16 aus Vehling, 1994). Zusätzlich werden die Derivate entsprechend der Ektoteloblasten, von denen sie abstammen, mit tiefgestellten Zahlen gekennzeichnet (eI_0 bis eI_5 , eII_0 bis eII_5 usw.).

E-Reihen = ektodermale Zellreihen, die keinen ektoteloblastischen Ursprung haben. Diese sind anterior der e-Reihen lokalisiert und entstehen aus den beiden Reihen A und B (siehe ABBILDUNG 6 A₁, A₂, E2 und E3).

a, b, c, d = Vier Zellreihen, die durch zwei mitotische Teilungen der Abkömmlinge der Ektoteloblasten gebildet werden. So entstehen nach der ersten Teilung aus el die beiden Tochterzellen lab und lcd, welche durch erneute Teilung die Zellen la, lb, lc und ld bilden (ABBILDUNG 5). Auch diese werden wie die Derivate der Ektoteloblasten durch tiefgestellte Zahlen den ursprünglichen Ektoteloblasten zugeordnet (la₀ bis la₉, lb₀ bis lb₉ usw.).

(l), (r) = Links und Rechts werden morphologisch gebraucht und entsprechen in der Ventralansicht der jeweiligen Körperseite.

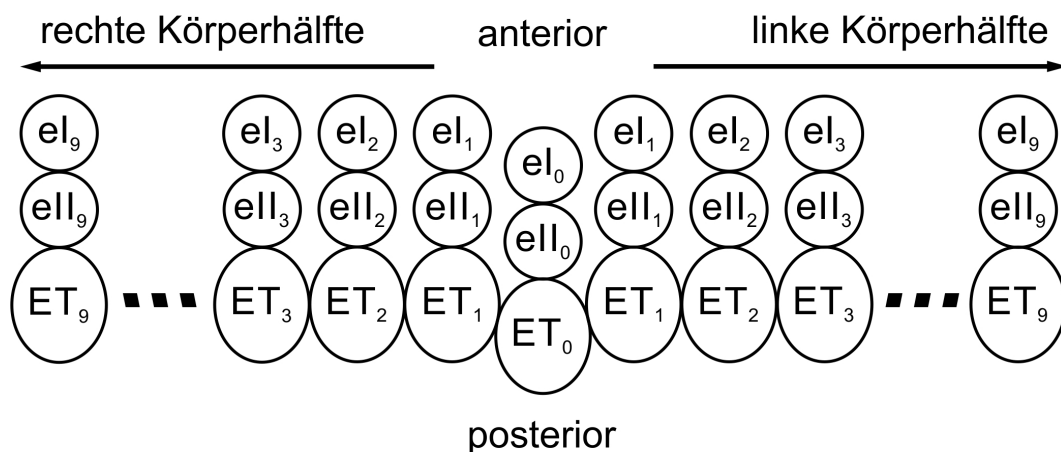


ABBILDUNG 4: Anordnung der Ektoteloblasten und ihrer Tochterzellen. Der mittlere Ektoteloblast (ET) ET₀ liegt etwas nach posterior verschoben. Seitlich reihen sich im Laufe der Entwicklung jeweils neun weitere Ektoteloblasten an. Alle Ektoteloblasten teilen sich inäqual in anteriore Richtung und bilden die e-Reihen (el₀-el₉ und ell₀-ell₉), die ein Gittermuster bilden. Rechts von ET₀ befindet sich die morphologisch linke Körperseite und umgekehrt.

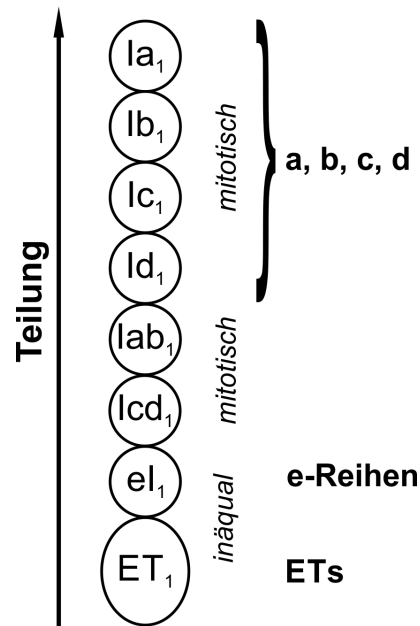


ABBILDUNG 5: Schema zur Teilungsaktivität der Ektoteloblasten. Die Zellteilung wird exemplarisch anhand der ersten Teilung des ET_1 gezeigt. ET_1 bildet durch inäquale Teilung die Tochterzelle e_1 (e-Reihen), die durch mitotische Teilungen zuerst die beiden Tochterzellen lab_1 und lcd_1 und anschließend die jeweiligen Derivate la_1 und lb_1 bzw. lc_1 und ld_1 generiert (Abkömmlinge a, b, c und d).

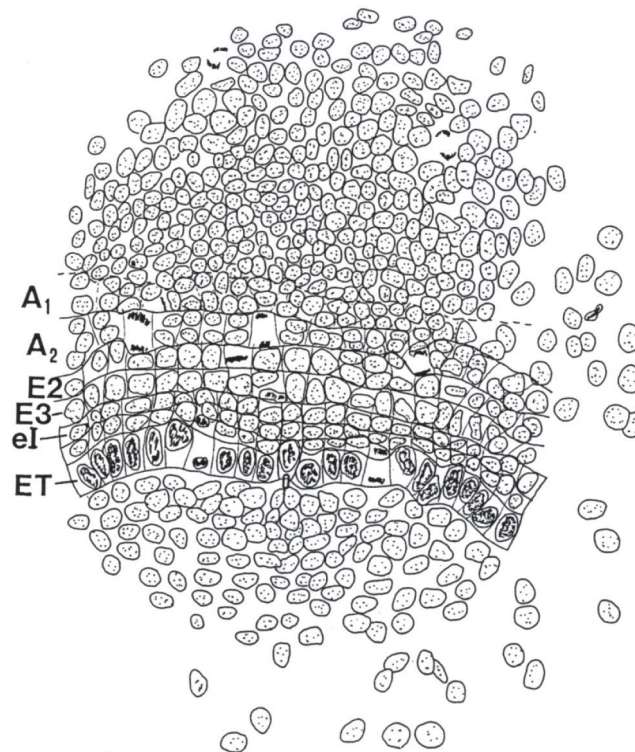


ABBILDUNG 6: Abbildung 16 aus Vehling, 1994.

2.5 Bild- und Videobearbeitung

Die digitale Bildbearbeitung und Erstellung der Bildtafeln erfolgte mit CorelDRAW Version 16.4.1.1281. Alle Filme wurden mit dem MovieMaker Version 2012 (Microsoft Corporation) bearbeitet und zusammengeschnitten.

Alle Darstellungen zeigen die Ventralseite der Embryonen, mit anterior nach oben und posterior nach unten ausgerichtet. In Folge dessen befinden sich die morphologisch linke Körperseite rechts im Bild und die morphologisch rechte Körperseite links im Bild.

Zur Optimierung von Kontrast, Schärfe und Helligkeit wurden die Originalbilder mit Microsoft Fotos 2019.18114.17710.0 von Microsoft Corporation bearbeitet. Das Licht wurde auf +10, die Schärfe auf 100 Prozent und die Vignette ebenfalls auf 100 Prozent erhöht. Mit Hilfe der Render-Methode „Methode C“ (Pyramide) in der Software Helicon Focus 6.5.3. und 7.0.2. (Helicon Soft Ltd.) wurden tiefenscharfe Bilder erzeugt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Vorgang der Zellmarkierung

Insgesamt wurden die Aufnahmen von 13 Embryonen ausgewertet und deren Entwicklungsverlauf miteinander synchronisiert und verglichen (ABBILDUNG 7). Davon zeigt ein Embryo die Bildung der Keimscheibe (Aufnahme 1) und zwölf Embryonen die Bildung und Teilungstätigkeit der Ektoteloblasten. Die längste und damit umfassendste Entwicklung konnte bei zwei Embryonen dokumentiert werden, die daher die Grundlage der folgenden Analysen bilden und im Folgenden als Embryo A (Aufnahmen 2 und 3) und Embryo B (Aufnahmen 4 und 5) gekennzeichnet sind. Die übrigen Embryonen wurden von eins bis acht durchnummeriert und nur ergänzend herangezogen. Zusätzlich wurde eine durch Herrn Dr. Carsten Wolff zur Verfügung gestellte Aufnahme aus dem Jahr 2011 analysiert, im Weiteren als Embryo C (Aufnahmen 6 und 7) bezeichnet, und die Aufnahme 1 aus der Dissertation von Dr. Andreas Hejnal (2002) vergleichend herangezogen, in den nachfolgenden Ausführungen als Embryo D (Aufnahme 8) benannt (Details zu den Aufnahmen 1 bis 8 siehe KAPITEL 6.2).

Alle Zellen wurden entsprechend ihres Zellschicksals nach einer rückwärtsgerichteten Analyse wie folgt gefärbt:

- **grün** sind Zellen des Mesentoderms, die während der Embryogenese einsinken und so den Gastrulationsporus bilden
- **blau** sind Zellen des inneren Halbkreises
- **hellblau** sind Abkömmlinge der Zellen des inneren Halbkreises
- **rot** sind Ektoteloblasten
- **orange** sind Zellen der e-Reihen
- **gelb** sind Teile der späteren Mittellinie
- **hellgrau** sind Zellen der Reihen A und B (E-Reihen)
- **rosa, braun** und **dunkelbraun** sind Zellen, die in späteren Absätzen gesondert dargestellt werden

- **dunkelgrau** sind alle übrigen Zellen der Keimscheibe, um die Gesamterscheinung der Keimscheibe als Referenz beizubehalten

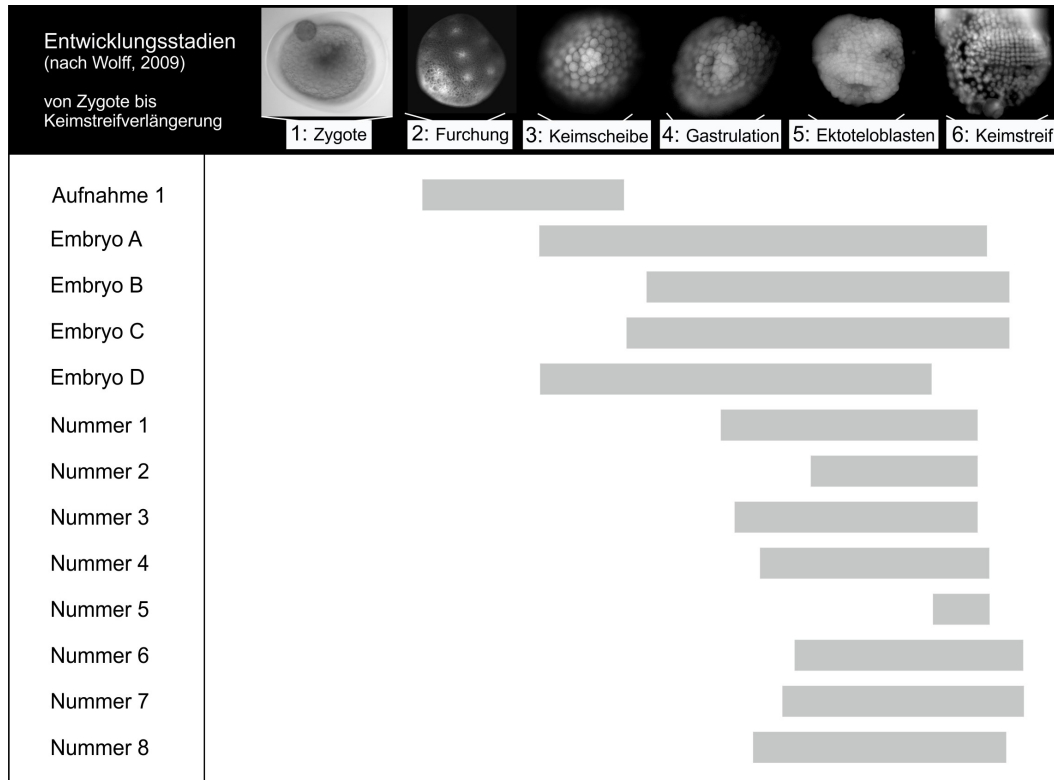


ABBILDUNG 7: Zusammenfassung aller Aufnahmen von *Porcellio scaber* in zeitlicher Korrelation zueinander. Die dokumentierte Entwicklung der Embryonen (markiert durch die grauen Streifen) wurden in die Entwicklungsstadien eins (Zygote) bis sechs (Keimstreif) nach Wolff (2009) eingestuft. Aufnahme 1 zeigt die frühen Furchungen und die Keimscheibenbildung, die Aufnahmen der Embryonen A bis D hingegen die Gastrulation, Bildung der Ektoteloblasten und deren Teilungstätigkeit (Bildung des Keimstreif), die Embryonen Nummer eins bis acht zeigen ausschließlich die Anordnung der Ektoteloblasten und die Bildung der ersten e-Reihen (eI, eII, eIII und eIV).

3.2 Keimscheibenbildung

3.2.1 Frühe Keimscheibenbildung

Die Embryonalentwicklung der Kellersassel (*Porcellio scaber*) beginnt mit insgesamt fünf synchronen und schräg zueinander ausgerichteten Teilungen. Zellmembranen werden bei sich superfiziell entwickelnden Embryonen, wie der Kellersassel, erst zu einem späteren Zeitpunkt

ausgebildet, weshalb im Folgenden bis zur Bildung von Zellmembranen von Kernteilungen gesprochen wird. Die ersten vier Kernteilungen erfolgen intralecithal, d.h. im Dotter gelegen (ABBILDUNG 8 A). Während der vierten Kernteilung beginnen die Kerne an die Eioberfläche zu wandern, bis sie diese am Ende der fünften Kernteilung erreicht haben und gleichmäßig verteilt sind (ABBILDUNG 8 B, C; Aufnahme 1, 0 s). Ab der sechsten Kernteilung verlaufen diese asynchron, d.h. die Kerne teilen sich sequentiell (vgl. verschiedene Linienlängen in ABBILDUNG 8 C). Dabei beginnen die Kernteilungen in einer Region des Eies und setzen sich zur gegenüberliegenden Seite des Eies hin fort (ABBILDUNG 8 D, E; Aufnahme 1, 10 s bis 14 s).

Nach der siebten Kernteilung wandert ein Teil der Zellkerne (durch orange-gestrichelten Linie in ABBILDUNG 8 F markiert) zu einer Region im Ei, wo sie sich akkumulieren und die frühe Keimscheibe bilden.

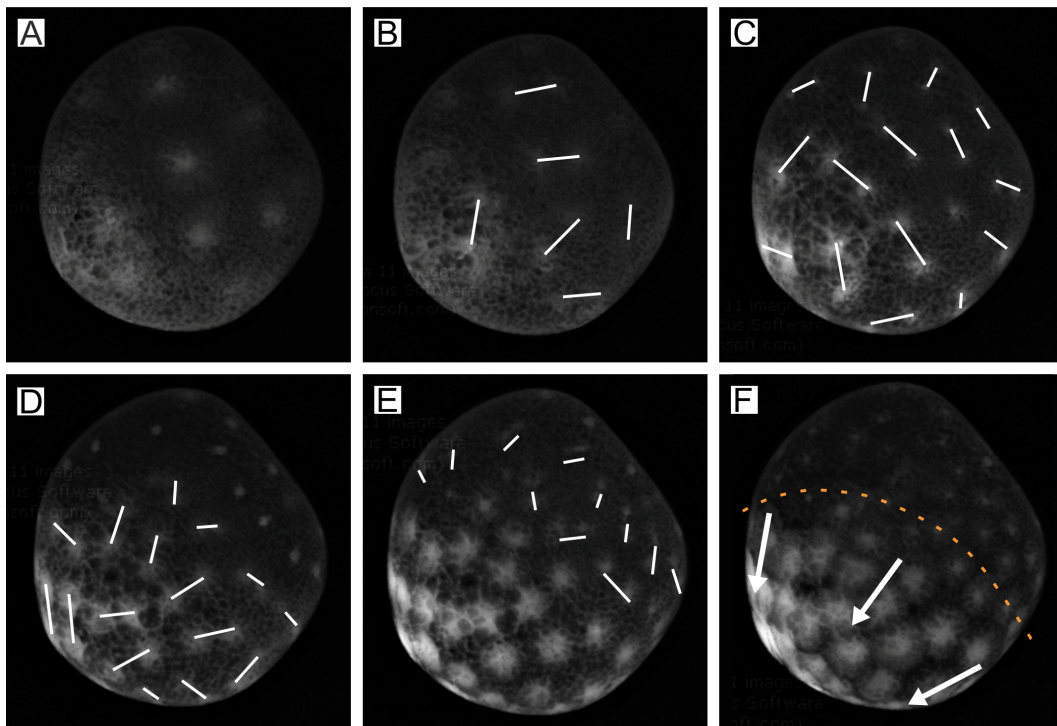


ABBILDUNG 8: Frühe Furchungen bis zur Keimscheibenbildung aus der Aufnahme 1. A: 16-Kernstadium; **B:** Fünfte synchrone Kernteilung; **C:** Sechste asynchrone Kernteilung, zu erkennen anhand der unterschiedlichen Länge der weißen Linien, die die beiden Tochterkerne verbinden; **D:** Beginn der siebten Teilung; **E:** Fortsetzung der siebten Teilung; **F:** Bildung der frühen Keimscheibe, die orange-gestrichelte Linie markiert die Grenze zwischen der sich bildenden Keimscheibe in der unteren Bildhälfte und dem extraembryonalen Bereich in der oberen Bildhälfte. Die Pfeile zeigen die Wanderungsrichtung der Zellkerne zum Eipol an, wo sie die Keimscheibe bilden. Weiße Linien verbinden die beiden Tochterkerne nach der Teilung.

3.2.2 Bildung von Zellmembranen während der Keimscheibenbildung

Nach dem sich die Mehrheit der Zellkerne in einem Bereich des Eies gesammelt und die frühe Keimscheibe gebildet hat (ABBILDUNG 9 A), bilden sich zwischen den Energiden die ersten Zellmembranen aus (superfizielle Furchung). Die Keimscheibe ist nun eine einschichtige Ansammlung gleichartiger Zellen, die im Weiteren Blastoderm genannt wird (Sternchen markierte Zellen in ABBILDUNG 9 B; Aufnahme 1, 14 bis 16 s). Im Randbereich der Keimscheibe lagern sich weitere Zellen der Keimscheibe an. Dabei finden schnell ablaufende Zellteilungen statt (Aufnahme 1, 32 bis 50 s). In diesem Stadium sind die Unterschiede zwischen den Zellen der Keimscheibe und den Übrigen deutlich zu erkennen: die Zellen der Keimscheibe sind um ein Vielfaches größer als die extraembryonalen Zellen (ABBILDUNG 9 A, B).

Sobald die Keimscheibe aus ca. hundert Zellen besteht, nimmt die Teilungsaktivität im Zentrum der Keimscheibe, dem späteren Gastrulationszentrum, und den unmittelbar darum liegenden Zellen ab (Aufnahmen 2 und 3, beide 0 bis 1 s). Nur noch im Randbereich der Keimscheibe finden vereinzelte Zellteilungen statt (Aufnahmen 2 und 3, beide 0 bis 1 s).

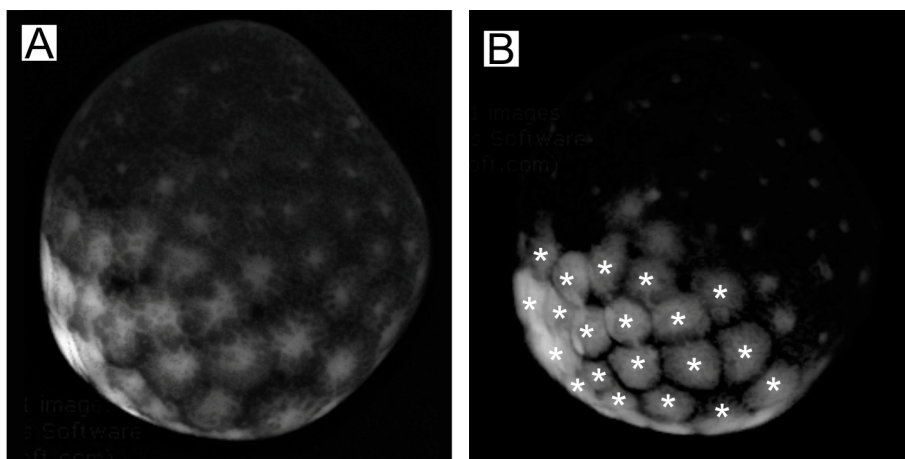


ABBILDUNG 9: Zellmembranbildung in der frühen Keimscheibe. **A:** Frühe Keimscheibe aus der Aufnahme 1, Stadium wie in ABBILDUNG 8 F; **B:** Ausbildung der ersten Zellmembranen. Sternchen markieren die Zellen, die eine Zellmembran aufweisen.

3.2.3 Späte Keimscheibe

Eine Unterscheidung der Zellen anhand von Zellform oder Größe ist innerhalb der Keimscheibe zu diesem Zeitpunkt nicht möglich (Aufnahmen 2, 0 s). Alle Zellen liegen in einer Ebene und sind gleichmäßig verteilt. Noch vor Beginn der Gastrulation sind einige Zellen in zwei Halbkreisen angeordnet, von denen einer aus einer Reihe von ungefähr zwölf Zellen besteht (ABBILDUNG 10 A). Diese sind leicht nach anterior konvergierend angeordnet und werden entsprechend ihrer anterioren Lage direkt am sich später entwickelndem Gastrulationszentrum im Folgenden als innerer Halbkreis bezeichnet (nach Vehling, 1994). Der zweite Halbkreis liegt außerhalb des inneren Halbkreises und besteht aus etwa 14 Zellen, die ebenso nach anterior konvergierend angeordnet sind und als äußerer Halbkreis bezeichnet werden (nach Vehling, 1994). Die Zellen des äußeren Halbkreises können im Embryo A entsprechend ihres künftigen Zellschicksals in zwölf Ektoteloblasten (rot markiert) und zwei Zellen der zukünftigen Reihen A und B unterschieden werden (gelb markiert; ABBILDUNG 10 A, B). Die zwei Zellen der späteren Reihen A und B liegen nebeneinander und rechts neben dem mittleren Ektoteloblasten (ET₀). Auch bei Embryo B und C befinden sich zwei bis drei Zellen der Reihen A und B im äußeren Halbkreis, sind jedoch rechts und links des mittleren Ektoteloblasten angeordnet (vgl. Aufnahmen 3, 5 und 7). Auf beiden Körperseiten reihen sich weitere Ektoteloblasten an, deren Anzahl sich auf beiden Körperseiten unterscheidet. Anterior des äußeren Halbkreises befinden sich bei Embryo A auf der linken Körperseite bereits vier Zellen der späteren Reihen A und B (hellgrau markiert; ABBILDUNG 10 A).

Mit Beginn der Gastrulation wandert eine zentrale Gruppe aus etwa 20 Zellen an einer Stelle unter das Blastoderm und bildet auf diese Weise den Gastrulationsporus (grün markierte Zellen in ABBILDUNG 10 A). Sie sind in einem Dreieck angeordnet, teilen sich während der fortschreitenden Gastrulation nicht weiter und bilden voraussichtlich das spätere Mesentoderm (ABBILDUNG 10 B). Nur wenige dieser Zellen, die sich im Randbereich der Zellgruppe befinden, teilen sich einmal bevor sie

im Gastrulationsporus einsinken (z.B. vier bei Embryo A; siehe Pfeilköpfe und Striche in ABBILDUNG 10 A-D). Nachdem die Zellen unter das Blastoderm gewandert sind, bleibt deren weiteres Schicksal unbeobachtet.

Im Verlauf der Gastrulation teilen sich die Zellen des inneren Halbkreises zweimal, wobei der Halbkreis erhalten bleibt (hellblau markiert; ABBILDUNG 10 C, D). Beim Embryo A vollziehen unterdessen mehrere Zellen des äußeren Halbkreises (dunkelbraun markiert) auf beiden Körperseiten eine Teilung und bilden die Ektoteloblasten r2, r3, r4 sowie l6/7 und l8 (rot markiert) sowie eine Zelle der künftigen Reihen A und B (hellgrau markiert; weiße Striche in ABBILDUNG 10 A, C). So entstehen im Embryo A durch äquale mitotische Teilungen im äußeren Halbkreis auf der linken Körperseite zwei und auf der rechten Körperseite drei weitere Zellen der künftigen Reihen A und B, die in KAPITEL 3.5.1 detaillierter beschrieben werden (ABBILDUNG 10 C). Auf der linken Körperseite befindet sich bei Embryo A eine Zelle, die sich in zwei Ektoteloblasten anstatt in einen Ektoteloblasten und eine Zelle der Reihen A und B teilt (rosa markiert; ABBILDUNG 10 C, D). Auch bei den Embryonen B, C und D kann eine solche Zelle auf der rechten oder linken Körperseite beobachtet werden (vgl. Aufnahmen 3, 5, 7 und 8).

Innerhalb des untersuchten Zellverbandes konnte bei Embryo A das Zellschicksal einer Zelle nicht geklärt werden (braun und mit Plus markiert; ABBILDUNG 10 A, B). Beide Derivate reihen sich nach einer mitotischen Teilung (längs ausgerichtet) in die Reihe der Ektoteloblasten ein (ABBILDUNG 10 C, D). Anschließend konnte jedoch keine weitere Teilung, wie sie die anderen Ektoteloblasten durchlaufen, beobachtet werden.

Zahlreiche weitere, nicht näher beschriebene Zellteilungen in der Peripherie der Keimscheibe führen zu einer stetigen Zunahme der Zellzahl (dunkelgrau markiert; vgl. zwischen ABBILDUNG 10 A, C und D).

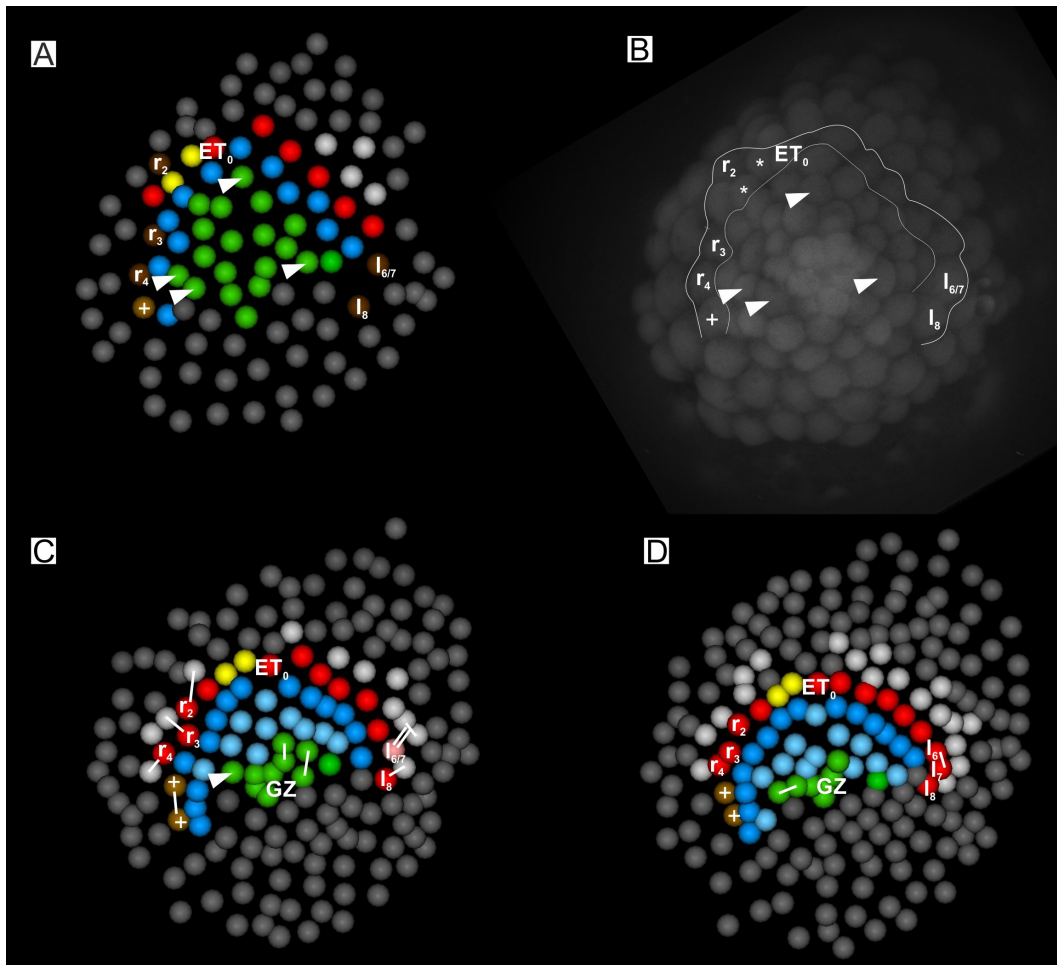


ABBILDUNG 10: Zelldifferenzierung der späten Keimscheibe in Embryo A. **A:** 3D Viewer Darstellung bei $t=0$ (0 min); Pfeilköpfe markieren die Zellen, die sich einmal teilen, bevor sie im Gastrulationsporus einsinken; der mittlere Ektoteloblast (ET_0) dient als Referenzpunkt zu den sich bildenden Ektoteloblasten der rechten Körperseite (r_2 , r_3 , r_4) und der linken Körperseite ($l_{6/7}$ und l_8) sowie der Zelle mit ungeklärtem Zellschicksal (+); **B:** Originalbild zu A bei $t=0$ als Vergleich; die Linien markieren den äußeren Halbkreis und die Sternchen die beiden Zellen der späteren Mittellinie; **C:** 3D Viewer Darstellung bei $t=95$ (1.425 min); weiße Linien verbinden die Tochterzellen der Mutterzelle nach ihrer Teilung und Doppellinien die Tochterzellen einer vorherigen Teilung; **D:** 3D Viewer Darstellung des gleichen Embryos bei $t=120$ (1.800 min). Grün = Mesentoderm; Hellblau = Derivate des inneren Halbkreises; Blau = innerer Halbkreis; Braun = teilt sich nicht mehr, ist jedoch Teil der Reihe der Ektoteloblasten; Dunkelbraun = teilen sich noch einmal in einen Ektoteloblasten und eine Zelle der Reihen A und B; Rot = Ektoteloblasten; Gelb = Zellen, die einen Teil der Mittellinie bilden; Rosa = teilt sich in zwei Ektoteloblasten; Hellgrau = Zellen der Reihen A und B (E-Reihen); Dunkelgrau = restlichen Zellen der Keimscheibe; GZ = Gastrulationszentrum.

3.2.4 Beobachtungen während der Gastrulation

Noch vor Beginn der Gastrulation treten zahlreiche Teilungen posterior des Gastrulationszentrums der Keimscheibe auf (ABBILDUNG 11 A; Aufnahmen 2 und 3, beide 0 bis 8 s). Nur wenige davon finden im Zentrum der Keimscheibe, bei den Zellen des Mesentoderms und Zellen posterior davon, statt (z.B. sechs bei Embryo A; siehe Striche in

ABBILDUNG 11 B). Die Zellteilungen nehmen weiter ab und die Keimscheibe besteht nun aus mehr als 150 Zellen. In der Peripherie der mesentodermalen Zellen (grün markiert) liegen nun einige Zellen zueinander lockerer, als die übrigen Zellen der Keimscheibe (zwischen den gepunkteten Linien in ABBILDUNG 11 C). Die dabei entstehende „Furche“ vergrößert sich zunehmend, während die Gastrulation beginnt und die ersten Zellen mittig und posterior der „Furche“ einsinken (ABBILDUNG 11 C, D). Anschließend beginnt die erste Teilungswelle des inneren Halbkreises (Aufnahme 3, 9 s bis 11 s). Die Gastrulation und die Teilung des inneren Halbkreises lassen in posteriorer Richtung einen Zellhaufen entstehen, der einen Hügel formt (ABBILDUNG 11 E, F). Zwei mesentodermale Zellen, die anterior und mittig liegen, bilden dabei die anteriore Grenze des sich bildenden Gastrulationsporus (geschwungene Linie; vgl. ABBILDUNG 11 A und E), wo die Zellen des künftigen Mesentoderms einsinken (ABBILDUNG 11 D, E, F). Durch Lockerung des Zellverbandes („Furche“) können sich Zellen aus dem Blastoderm lösen und zwischen Blastoderm und Eidotter wandern. Die Derivate des inneren Halbkreises verdrängen dabei ein Teil der Zellen des Mesentoderms, die infolgedessen im Gastrulationsporus unter das Blastoderm sinken. Mit Beendigung der ersten Teilungswelle des inneren Halbkreises sind alle Zellen des Mesentoderms eingesunken und der Gastrulationsporus geschlossen und nicht mehr zu erkennen (ABBILDUNG 12 A, B bei $t=169, 2.535$ min). Nach dem Ende der Gastrulation beginnt die zweite Teilungswelle des inneren Halbkreises, der jedoch erhalten bleibt (Aufnahme 3, 43 s und 57 s). Der Gastrulationsporus wird durch die Derivate des inneren Halbkreises ausgekleidet (ABBILDUNG 11 F; ABBILDUNG 12 C bei $t= 266, 3.990$ min). Aufgrund des methodischen Ansatzes kann über das weitere Schicksal der eingesunkenen Zellen keine Aussage getroffen werden.

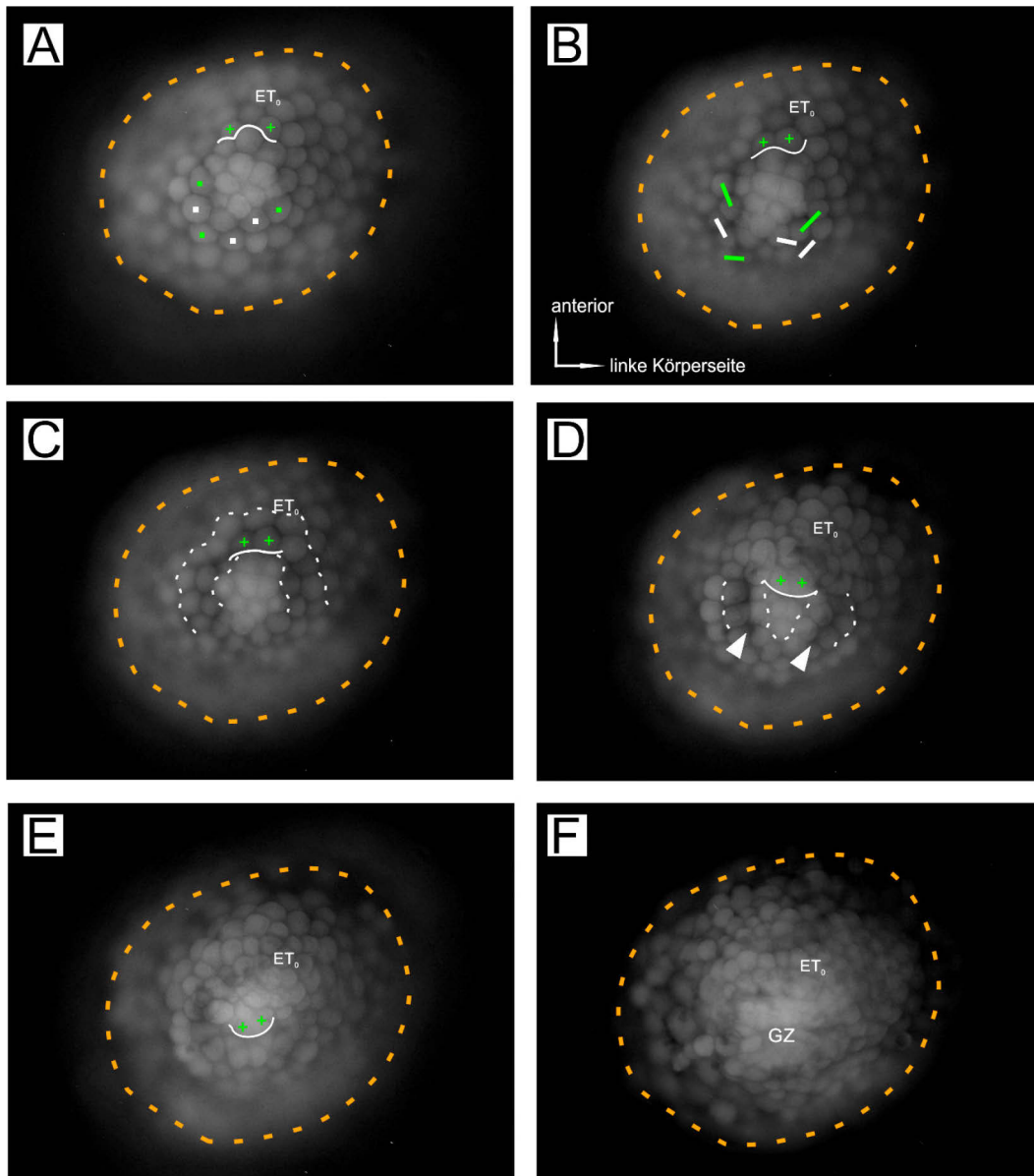


ABBILDUNG 11: Gastrulation bei *Porcellio scaber*. Tiefenscharfe Bilder verschiedener Zeitpunkte vom Embryo A. **A:** bei $t=0$ (0 min), die geschwungene Linie markiert die anteriore Grenze des sich bildenden Gastrulationsporus (A-E), mit einem grünen „+“ markierte Zellen des Gastrulationszentrums wandern als Letztes in den Gastrulationsporus ein (A-E), die mit einem Punkt gekennzeichneten Zellen teilen sich; **B:** bei $t=15$ (225 min), die Striche verbinden die Tochterzellen nach der Teilung ihrer Mutterzellen; **C:** Gastrulationsbeginn bei $t=31$ (465 min), zwischen den beiden gepunkteten Linien zeigt sich die bildende „Furche“; **D:** Gastrulation bei $t=65$ (975 min) mit sich verkürzender „Furche“ (Pfeil); **E:** bei $t=95$ (1.425 min), keine „Furche“ mehr erkennbar; **F:** Ende der Gastrulation bei $t=130$ (1.950 min) mit geschlossenem Gastrulationsporus im Gastrulationszentrum (GZ). ET_0 = mittlerer Ektoteloblast.

3.3 Formierung der Ektoteloblasten

Noch vor Gastrulationsbeginn sind mindestens sieben Ektoteloblasten (rot markiert) determiniert, das bedeutet, dass sie sich erst erneut teilen werden, wenn sie durch inäquale Teilungen die e-Reihen bilden (sieben bei Embryo A; ABBILDUNG 10 A). Sie sind in Größe und Form nicht von anderen Blastodermzellen (dunkelgrau markiert) unterscheidbar und nur bei Embryo A mehrheitlich auf der linken Körperseite zu finden (ABBILDUNG 10 B; ABBILDUNG 12 A). An den Enden des Halbkreises von Embryo A teilen sich insgesamt vier Zellen (dunkelbraun markiert) jeweils einmal und bilden einen Ektoteloblasten und eine Zelle der Reihen A und B (hellgrau markiert; ABBILDUNG 10 C). Eine fünfte Zelle auf der linken Körperseite bildet im Gegensatz dazu eine Zelle der Reihen A und B und eine Zelle (rosa markiert), die sich kurz vor Ende der Gastrulation in einer zweiten mitotischen Teilung in zwei Ektoteloblasten teilt (Embryo A; vgl. ABBILDUNG 10 C, D; Aufnahme 3, 30 s).

Die Ektoteloblasten ordnen sich in einer nach anterior konvergierenden Reihe an und bilden den äußeren Halbkreis (ABBILDUNG 10 A, B). Nur beim Embryo A konnte auf der rechten Körperseite noch vor Beginn der Gastrulation eine Teilung einer Zelle quer zur Reihe der Ektoteloblasten beobachtet werden, die sich auf dieser Körperseite in deren Reihe einordnet (braun markiert; vgl. ABBILDUNG 10 A und C; Aufnahme 3, 0 s bis 1 s). Die zwei Tochterzellen teilen sich im Gegensatz zu den übrigen Ektoteloblasten im weiteren Verlauf der Embryogenese nicht noch einmal, verbleiben jedoch in der Reihe der Ektoteloblasten (ABBILDUNG 12 B, C). Auch beim Embryo B konnte eine Zelle mit ungeklärtem Zellschicksal (braun markiert) beobachtet werden. Diese Zelle entsteht mit einem Ektoteloblasten durch mitotische Teilung einer Vorläuferzelle (rosa markiert) und reiht sich in den Halbkreis der Ektoteloblasten ein. Jedoch konnte wie beim Embryo A keine weitere Teilung dieser Zelle beobachtet werden (Aufnahme 5, 9 s bis 10 s).

Mindestens zwei Zellen, die Teile der späteren Mittellinie bilden, sind ebenfalls in der Reihe der Ektoteloblasten angeordnet (gelb markiert;

ABBILDUNG 10 A, C, D). Nach dem Ende der Gastrulation wandern diese dann nach anterior aus der Reihe heraus (ABBILDUNG 12 A, B). Der äußere Halbkreis besteht ausschließlich aus Ektoteloblasten, mit Ausnahmen bei Embryo A und Embryo B (Embryo A: vgl. ABBILDUNG 12 B mit ABBILDUNG 14 A-C; Embryo B: Aufnahme 5, 9 s bis 10 s).

Der Halbkreis der Ektoteloblasten richtet sich zum Ende der Gastrulation und während der Teilungsaktivität des inneren Halbkreises in einer geraden Linie aus (vgl. ABBILDUNG 10 A und D mit ABBILDUNG 12 B und C). Mit dem Schließen des Gastrulationsporus bewegen sich die mittleren Ektoteloblasten nach posterior in Richtung des Gastrulationsporus und die Ektoteloblasten am Rand der Reihe in anteriore Richtung. Wenn aus dem ursprünglichen Halbkreis fast eine Gerade geworden ist, beginnen die Ektoteloblasten sich zu teilen und so die erste e-Reihe (el) zu bilden (vgl. ABBILDUNG 10 D und ABBILDUNG 12 B und C). Sobald die erste e-Reihe gebildet ist, können die Ektoteloblasten von den übrigen Blastodermzellen aufgrund ihrer charakteristischen Größe und länglichen Form eindeutig unterschieden werden (Aufnahme 2, bei 1 min 5 s).

Die Zahl der Ektoteloblasten variiert zwischen den Körperseiten und zwischen den drei Embryonen nur gering (TABELLE 3). Eine Ausnahme bildet der Embryo A, bei welchem die linke Körperseite zum Ende der Gastrulation aus acht Ektoteloblasten und die rechte Seite nur aus vier Ektoteloblasten besteht (siehe auch ABBILDUNG 10 D; ABBILDUNG 12 B). Dieser Unterschied ist jedoch wahrscheinlich auf eine frühe Fehlentwicklung zurückzuführen. Nach dem Ende der Gastrulation und mit Beginn der Teilung der Ektoteloblasten fehlen im Vergleich zu den Literaturangaben (19 bis 23 und damit neun bis elf Ektoteloblasten je Körperseite) zumeist pro Körperseite ein bis zwei Ektoteloblasten, deren Bildung aufgrund fehlender Daten bei keinem Embryonen beobachtet werden konnte (ABBILDUNG 12 B; ABBILDUNG 14 D-F).

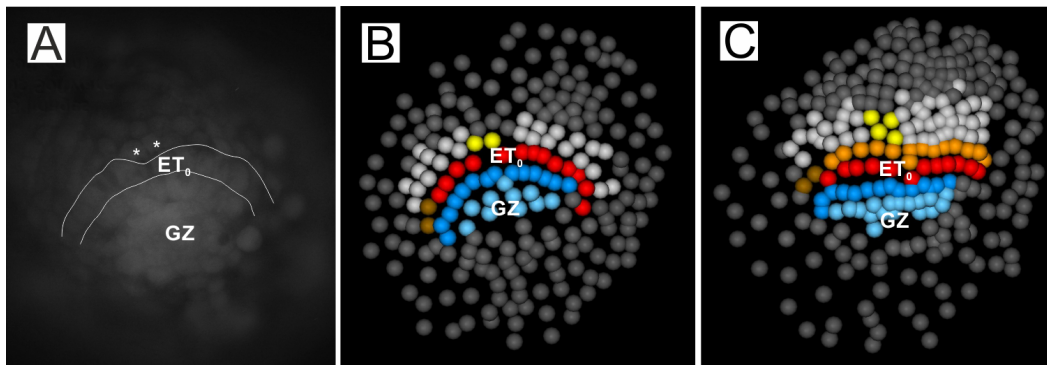


ABBILDUNG 12: Veränderung der Halbkreise im Embryo A. **A:** Originalbild bei $t=169$ (2.535 min), Sternchen kennzeichnen Zellen, die einen Teil der späteren Mittellinie bilden (gelb in B und C), die Linien markieren die Reihe der Ektoteloblasten; **B:** 3D Viewer Darstellung des Stadiums in A ($t=169$; 2.535 min); **C:** 3D Viewer Darstellung bei $t=266$ (3.990 min). Der mittlere Ektoteloblast (ET_0) und das Gastrulationszentrum (GZ) sind zur Orientierung angegeben. Blau = innerer Halbkreis; Hellblau = Derivate des inneren Halbkreises; Braun = teilen sich nicht mehr, sind jedoch Teil der Reihe der Ektoteloblasten; Rot = Ektoteloblasten; Orange = e-Reihen (Derivate der Ektoteloblasten); Gelb = Zellen, die einen Teil der Mittellinie bilden; Hellgrau = Zellen der Reihen A und B (E-Reihen); Dunkelgrau = restlichen Zellen der Keimscheibe.

TABELLE 3: Anzahl der Ektoteloblasten im Verlauf der Entwicklung dreier Embryonen (A, B, C). Daten zur Keimstreifverlängerung fehlen. Embryo A zeigt durch die deutlich geringere Anzahl von Ektoteloblasten auf der rechten Körperseite wahrscheinlich eine frühe Fehlentwicklung.

Embryo	A		B		C	
	links	rechts	links	rechts	links	rechts
bei Dokumentationsbeginn	5	1	7	8	6	4
vor der Gastrulation	6	4	7	8	8	7
während der Gastrulation	8	4	7	8	8	7
vor der Teilungsaktivität der Ektoteloblasten	8	4	7	8	8	7
mit Beginn der Teilungsaktivität der Ektoteloblasten	8	4	8	8	8	7

3.4 Zellteilungsmuster der Ektoteloblasten

Die Bildung der ersten e-Reihe konnte bei elf Embryonen (A, B, C, 1 bis 8; siehe ABBILDUNG 7) dokumentiert und ausgewertet werden. Da Teilungsabfolge und Teilungsaktivität der Ektoteloblasten auf beiden Körperseiten nicht festgelegt sind und sich zwischen den Embryonen unterscheiden, werden drei davon (A, B und C) im Folgenden separat beschrieben. Die Ergebnisse der übrigen acht Embryonen (siehe TABELLE A11) werden nur ergänzend bei der Bildung der dritten und vierten e-Reihe und dem Beginn der mitotischen Teilung hinzugezogen (TABELLE 5).

3.4.1 Bildung der ersten e-Reihe (el)

Im Embryo A beginnt unmittelbar nach der Teilung der beiden Zellen der späteren Mittellinie die Teilung der Ektoteloblasten auf der linken Körperseite (ektoteloblastische Teilung; A in TABELLE 4; TABELLE A11). Zu diesem Zeitpunkt der Entwicklung ist die Reihe der Ektoteloblasten nahezu vollständig ausgebildet (acht von mindestens neun Ektoteloblasten vorhanden) und in einer geraden Linie angeordnet (vgl. ABBILDUNG 12 B und C). Die Teilungen beginnen auf der linken Körperseite zunächst bei ET_2 und ET_3 , gefolgt von ET_1 (ABBILDUNG 13 A). Nachdem sich auch die Ektoteloblasten ET_4 und ET_5 der linken Körperseite geteilt haben, teilt sich der mediane ET_0 . Anschließend beginnt die Teilungswelle auf der rechten Körperseite, die bei ET_1 anfängt und lückenlos nach außen verläuft (A in TABELLE 4; ABBILDUNG 13 B; TABELLE A11). Unterdessen verläuft die Bildung der ersten e-Reihe der linken Körperseite weiter bis zum ET_8 .

Anders verhält es sich beim Embryo B, bei dem die Bildung der ersten e-Reihe auf der rechten Körperseite beginnt (B in TABELLE 4; ABBILDUNG 13 A; TABELLE A11). Die linke Körperseite beginnt jedoch nur kurze Zeit später mit der Bildung der ersten e-Reihe, sodass sich die Ektoteloblasten beider Körperseiten innerhalb eines kurzen Zeitraums komplett teilen. Beispiele dafür sind die gleichzeitige Teilung der beiden Ektoteloblasten ET_4 und die Teilung des rechten Ektoteloblasten ET_6 , dem unmittelbar der ET_6 der linken Körperseite folgt (B in TABELLE 4, Abfolge-Nr. 6 und 12-13; TABELLE A11). In diesem Embryo verläuft die Teilungswelle deutlicher von innen nach außen als beim Embryo A. Die Ektoteloblasten ET_2 beider Körperseiten beginnen mit der Bildung der ersten e-Reihe, unmittelbar gefolgt von den linken ET_1 und ET_3 , denen dann der rechte ET_3 und die ET_4 beider Körperseiten folgen (ABBILDUNG 13 A, B). Dabei verläuft die Teilungswelle jedoch nicht strikt weiter von innen nach außen, sodass sich z.B. auf der rechten Körperseite ET_7 und ET_8 vor ET_6 teilen (ABBILDUNG 13 B). Nachdem sich auf beiden Körperseiten fünf Ektoteloblasten geteilt haben, teilt sich der mediane ET_0 (B in TABELLE 4; TABELLE A11).

Die Teilungsabfolge des Embryos C ähnelt der des Embryos A. Bei diesem beginnt die Teilungswelle ebenfalls auf der linken Körperseite, die sich von ET₂ bis ET₅ fortsetzt, wobei jedoch ET₄ übersprungen wird (ABBILDUNG 13 A). Anschließend fängt die rechte Körperseite mit der ersten Teilungswelle an und der linke ET₄ teilt sich. Auf der rechten Körperseite ist ET₁ der erste sich teilende Ektoteloblast, gefolgt von ET₅, ET₂, ET₃, ET₄ und schließlich ET₆ (ABBILDUNG 13 B). Die Teilung des medianen Ektoteloblasten ET₀ erfolgt, wenn auf der linken Körperseite fünf und auf der rechten drei Zellen der ersten e-Reihe gebildet sind (C in TABELLE 4; TABELLE A11).

3.4.2 Bildung der zweiten e-Reihe (ell)

Im Embryo A beginnt mit Abschließen der ersten Teilungswelle auf der rechten Körperseite zeitgleich die Bildung der zweiten e-Reihe auf der linken Körperseite (A in TABELLE 4, Abfolge-Nr. 11; TABELLE A11). Sie verläuft in einer durchgehenden Teilungswelle von ET₁ bis ET₆ (ABBILDUNG 13 C). Nach der Teilung des Ektoteloblasten ET₅ teilt sich auch ET₀ ein zweites Mal und die rechte Körperseite beginnt mit der Bildung der zweiten e-Reihe, startend bei ET₁ (A in TABELLE 4; TABELLE A11).

Im Embryo B beginnt im Unterschied zu Embryo A die zweite Teilungswelle beim linken ET₂ (B in TABELLE 4; ABBILDUNG 13 C; TABELLE A11). Die Teilung des übersprungenen ET₁ wird auf beiden Körperseiten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nachgeholt (B in TABELLE 4; ABBILDUNG 13 C, D; TABELLE A11). Dieser teilt sich auf der rechten Körperseite nach ET₄, gemeinsam mit ET₅, und auf der linken Körperseite schon nach ET₃ (ABBILDUNG 13 D). Auch der linke Ektoteloblast ET₄ teilt sich nicht der Teilungswelle von innen nach außen folgend nach ET₃, sondern erst nach ET₅. Nachdem sich beide ET₅ geteilt haben, bildet ET₀ den zweiten Abkömmling (B in TABELLE 4; TABELLE A11).

Im Embryo C sind Parallelen zu den Embryonen A und B feststellbar. Die zweite Teilungswelle beginnt auf der linken Körperseite und verläuft sprunghaft von ET₃ zu ET₂, gefolgt von ET₁+ET₅, ET₄, ET₇, ET₆ und

schließlich ET_8 (ABBILDUNG 13 C). Auf der rechten Körperseite beginnt die Bildung der zweiten e-Reihe bei ET_1 und setzt sich dann bei ET_2 und ET_3 fort (ABBILDUNG 13 D). Wie die rechte Körperseite die Teilungswelle beendet, ist aufgrund fehlender Daten nicht bekannt. Im Vergleich zum zweiten Embryo (B) erfolgt die Teilung des medianen Ektoteloblasten ET_0 deutlich eher, nämlich sobald fünf Ektoteloblasten auf der linken und einer auf der rechten Körperseite die zweite e-Reihe gebildet haben (C in TABELLE 4; TABELLE A11).

3. ERGEBNISSE

TABELLE 4: Teilungsreihenfolge der Ektoteloblasten dreier Embryonen (A, B, C). Kursiv ist die Bildung der ersten e-Reihe (el); Unterstrichen die Bildung der zweiten e-Reihe (elI); für Embryo B ist der Beginn der Bildung der dritten e-Reihe (elII) mit erfasst worden; Fett markiert ist der mittlere Ektoteloblast ET₀; (l) = linke Körperseite; min = Minuten; (r) = rechte Körperseite.

Embryo A			B			C		
Abfolge	Ektoteloblast	Zeitpunkt (in min)	Abfolge	Ektoteloblast	Zeitpunkt (in min)	Abfolge	Ektoteloblast	Zeitpunkt (in min)
1	<i>(l)2, (l)3</i>	2.760	1	<i>(r)2</i>	2.070	1	<i>(l)2</i>	1.844
2	<i>(l)1</i>	2.775	2	<i>(l)2</i>	2.310	2	<i>(l)3</i>	1.859
3	<i>(l)4</i>	2.835	3	<i>(l)3</i>	2.340	3	<i>(l)1</i>	1.892
4	<i>(l)5</i>	2.940	4	<i>(l)1</i>	2.370	4	<i>(l)5</i>	1.908
5	0	3.075	5	<i>(r)3</i>	2.400	5	<i>(r)1</i>	1.940
6	<i>(r)1</i>	3.120	6	<i>(l)4, (r)4</i>	2.490	6	<i>(r)5</i>	1.947
7	<i>(r)2</i>	3.330	7	<i>(r)5</i>	2.610	7	<i>(l)4</i>	1.950
8	<i>(l)8</i>	3.450	8	<i>(r)1</i>	2.640	8	<i>(r)2</i>	1.968
9	<i>(l)6</i>	3.555	9	<i>(l)5</i>	2.670	9	0	1.970
10	<i>(r)3</i>	3.780	10	<i>(r)7, 0</i>	2.700	10	<i>(r)3</i>	2.022
11	<i>(l)1, (r)4</i>	3.990	11	<i>(r)8</i>	2.760	11	<i>(r)4</i>	2.027
12	<i>(l)2</i>	4.140	12	<i>(r)6</i>	2.790	12	<i>(r)6</i>	2.030
13	<i>(l)3</i>	4.170	13	<i>(l)6, (l)7</i>	2.910	13	<i>(l)7</i>	2.070
14	<i>(l)4</i>	4.185	14	<i>(l)2</i>	3.180	14	<i>(l)6</i>	2.087
15	<i>(l)5</i>	4.395	15	<i>(l)3, (r)2</i>	3.240	15	<i>(l)8</i>	2.135
16	0	4.455	16	<i>(l)1</i>	3.270	16	<i>(l)3</i>	2.414
17	<i>(r)1</i>	4.785	17	<i>(r)3</i>	3.330	17	<i>(l)2</i>	2.417
18	<i>(l)6</i>	4.845	18	<i>(r)4</i>	3.360	18	<i>(l)1, (l)5</i>	2.441
			19	<i>(l)5, (r)1, (r)5</i>	3.390	19	<i>(r)1</i>	2.469
			20	0	3.450	20	<i>(l)4, 0</i>	2.493
			21	<i>(l)4, (r)6</i>	3.510	21	<i>(r)2</i>	2.498
			22	<i>(l)6, (l)7, (r)7</i>	3.540	22	<i>(r)3</i>	2.540
			23	<i>(l)8</i>	3.630	23	<i>(l)7</i>	2.588
			24	<i>(l)2</i>	3.690	24	<i>(l)6</i>	2.607
			25	<i>(l)3</i>	3.720	25	<i>(l)8</i>	2.672
			26	<i>(l)1</i>	3.750			
			27	<i>(r)2</i>	3.810			
			28	<i>(r)1, (r)3, (r)4</i>	3.840			

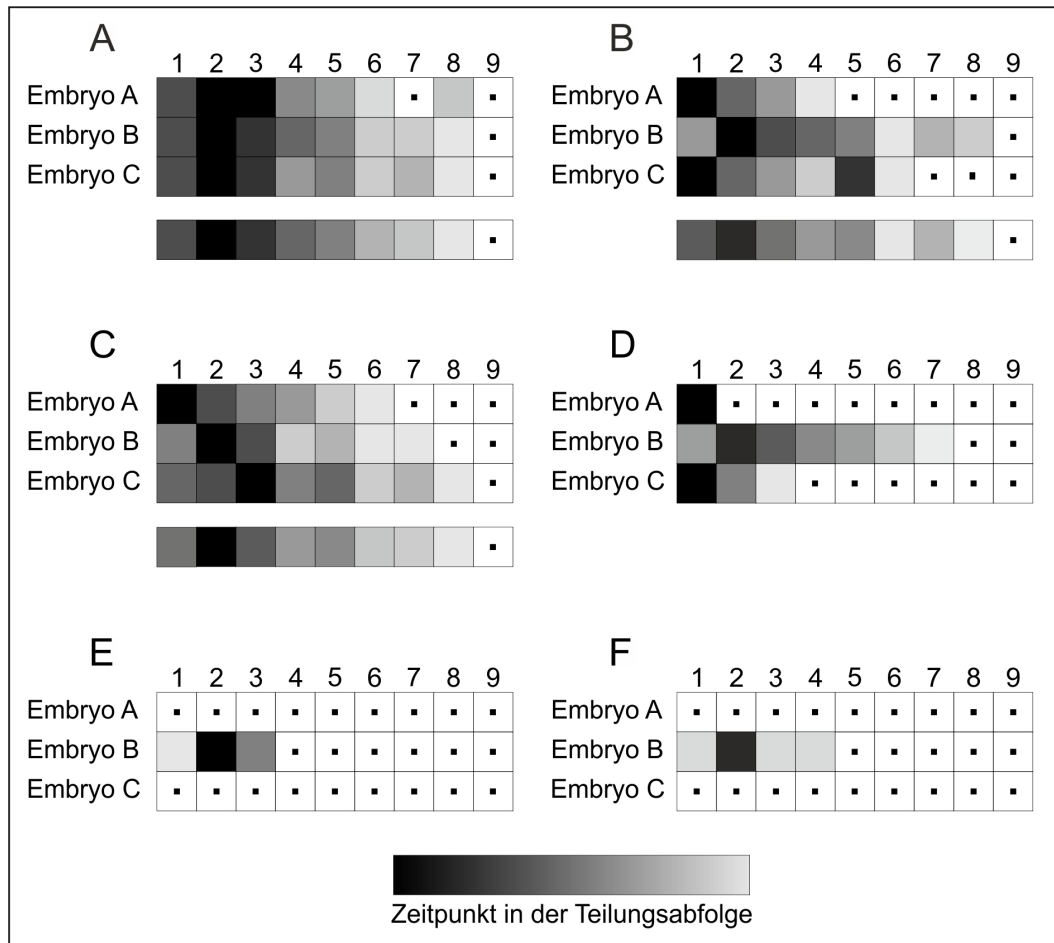


ABBILDUNG 13: Teilungsmuster der Ektoteloblasten beider Körperseiten. **A, C und E** zeigen die linke Körperseite, **B, D und F** die rechte Körperseite; dargestellt sind die Teilungsabfolgen von drei Embryonen (A, B, C) sowie eine durchschnittliche Teilungsabfolge abgeleitet aus allen drei Embryonen, die als Summe aus den Position der einzelnen Ektoteloblasten in der Teilungswelle ermittelt wurde. (**A, B**) Bildung der ersten e-Reihe (eI); (**C, D**) Bildung der zweiten e-Reihe (eII); (**E, F**) Bildung der dritten e-Reihe (eIII). Die verschiedenen Graustufen beschreiben die Reihenfolge der Zellteilungen vom ersten sich teilenden Ektoteloblasten (schwarz) bis zum letzten sich teilenden Ektoteloblasten (hellgrau), weiße Kästchen mit einem Punkt markieren fehlende Daten. Das Teilungsmuster der Ektoteloblasten beider Körperseiten wurde für alle Embryonen (nach ABBILDUNG 13) getrennt betrachtet, siehe ABBILDUNG A21 und ABBILDUNG A22 im KAPITEL 6.3.

3.4.3 Bildung der dritten e-Reihe (eIII)

Die Bildung der dritten e-Reihe konnte beim Embryo B nur noch teilweise, dafür jedoch bei zwei anderen Embryonen (Nr. 6 und 7) vollständig beobachtet werden (TABELLE 5). Sie beginnt im Embryo B beim linken ET₂ noch während der zweiten Teilungswelle, gefolgt von ET₃ und ET₁ (B in TABELLE 4; ABBILDUNG 13 E). Anschließend beginnt auf der rechten Körperseite die Bildung der dritten e-Reihe bei ET₂, dem in

einer zeitgleichen Teilung die Ektoteloblasten ET_3 , ET_4 und ET_1 folgen (ABBILDUNG 13 F).

Im Embryo 6 beginnt die dritte Teilungswelle auf der linken Körperseite bei den Ektoteloblasten ET_1 und ET_2 und verläuft dann in fortlaufender Reihenfolge von ET_3 bis ET_5 (blau markiert; Embryo 6 in TABELLE 5). Auf der rechten Körperseite hingegen teilen sich zuerst ET_2 und ET_3 , gefolgt von ET_4 bis ET_6 . Die Teilung von ET_1 erfolgt erst, nachdem sich ET_4 geteilt hat, und findet im Vergleich zum Embryo B später statt. Die Teilung des mittleren Ektoteloblasten ET_0 schließt bei diesem Embryo die Bildung der dritten e-Reihe ab.

Die dritte Teilungswelle der Ektoteloblasten beginnt im Embryo 7 auf beiden Körperseiten bei ET_2 , gefolgt vom linken ET_1 . Anschließend verläuft die Teilungswelle lückenlos bis zum Ektoteloblasten ET_6 . Die Teilungen der Ektoteloblasten verlaufen auf der rechten Körperseite nicht in einer durchgehenden Welle, da die Ektoteloblasten ET_1 und ET_4 übersprungen werden und deren Teilungen erst erfolgen, wenn sich ET_9 geteilt hat (blau markiert; Embryo 7 in TABELLE 5). Nachdem sich die beiden Ektoteloblasten ET_5 geteilt haben, teilt sich der mediane ET_0 .

3.4.4 Bildung der vierten e-Reihe (eIV) und Beginn der mitotischen Teilungen

Die Bildung der vierten e-Reihe wurde nur bei zwei Embryonen (Nr. 6 und 7) noch dokumentiert. Im Embryo 6 verläuft diese ähnlich wie die der Dritten und beginnt auf der linken Körperseite bei ET_1 . Sie setzt sich kontinuierlich bis zum fünften Ektoteloblasten fort (rot markiert; Embryo 6 in TABELLE 5). Anders erfolgen die Teilungen auf der rechten Körperseite, die erst beginnen, wenn sich der linke ET_4 geteilt hat. Nachdem sich auf der rechten Körperseite zuerst der ET_2 teilt, gefolgt vom ET_1 , setzt sich die Teilungswelle anschließend durchgehend nach außen fort (rot markiert; Embryo 7 in TABELLE 5). Die Teilung des mittleren Ektoteloblasten wurde nicht mehr dokumentiert.

Die vierte Teilungswelle im Embryo 7 unterscheidet sich von der im Embryo 6. Die Teilung des vierten Ektoteloblasten ET_4 wurde für beide Körperseiten nicht dokumentiert. Die Bildung der vierten e-Reihe beginnt auf der rechten Körperseite, wo sich zuerst ET_2 und ET_3 teilen. Anschließend teilen sich ET_7 und ET_5 zeitgleich mit ET_8 und ET_9 , gefolgt von ET_6 . Auf der linken Körperseite beginnt die Teilungswelle mit einer zeitgleichen Teilung der Ektoteloblasten ET_1 , ET_2 und ET_3 , gefolgt von der Teilung des ET_5 und ET_6 (rot markiert; Embryo 7 in TABELLE 5). Die Teilung des medianen Ektoteloblasten ET_0 erfolgt, wenn auf der rechten Körperseite sechs und auf der linken drei Zellen der vierten e-Reihe gebildet sind.

Nachdem die ersten e-Reihen von den Ektoteloblasten gebildet wurden, beginnen auch die Zellen der e-Reihen mit ihrer Teilung (ABBILDUNG 5). Sie teilen sich zweimal mitotisch und bilden insgesamt vier Zellreihen (erst ab- und cd-Zellen, dann a-, b-, c- und d-Zellen; ABBILDUNG 5). Der Beginn der ersten mitotischen Teilung konnte für zwei Embryonen (Nummer 6 und 7) dokumentiert und ausgewertet werden. Bei beiden Embryonen beginnt diese indessen die vierte e-Reihe gebildet wird (fett markiert in TABELLE 5). Auch diese erfolgt, wie die Teilungen der Ektoteloblasten zur Bildung der e-Reihen, von innen nach außen (in Form einer Welle), wobei vereinzelt Zellen der Reihe übersprungen werden. Die mitotischen Teilungen setzten bei beiden Embryonen auf der linken Körperseite zuerst ein, während auf der rechten Körperseite die Bildung der ab- und cd-Zellen zeitlich versetzt beginnt (TABELLE 5).

TABELLE 5: Teilungsabfolge der Ektoteloblasten und Beginn der mitotischen Teilungen bei den Embryonen Nummer 6 und 7. Grau hinterlegt ist die Bildung der ersten e-Reihe (eI), Grün hinterlegt die zweite (eII) und Blau die dritte Teilungswelle (eIII). Rot hinterlegt ist die Bildung der vierten e-Reihe (eIV) und fett sind jene Zellen der ersten e-Reihe (eI) hervorgehoben, die sich zum ersten Mal mitotisch teilen.

Abfolge	6	7
1	(l)1,(l)2	(r)3
2	(l)3,(l)4,(r)2	(l)2
3	(r)3	(l)1,(l)3
4	(r)4	(l)4,(r)2,(r)4
5	(r)5,(r)6	(r)5
6	(l)5,(r)1	(l)5,(l)6
7	0	(r)6,0
8	(l)1,(l)2	(r)7
9	(l)3,(r)3	(r)8
10	(l)4,(r)2	(r)9
11	(r)4	(r)3
12	(r)1,(r)5	(l)1,(l)2,(l)3,(l)4,(r)2,(r)5
13	(l)5	(r)4
14	(r)6	(r)1
15	0	(l)5,(l)6
16	(l)1,(l)2	(r)6,0
17	(l)3	(r)7,(r)8
18	(l)4,(r)2,(r)3	(r)9
19	(r)4	(l)2,(r)2,(r)3
20	(r)1	(l)1,(l)3,(l)4,(r)1,(r)5
21	(r)5	(l)5,0
22	(l)5	(l)6,(r)6
23	(r)6	(r)7,(r)8
24	0	(r)9
25	(l)1	(r)2,(r)3
26	(l)2	(l)1,(l)2,(l)3,(r)1
27	(l)3	(r)4,(r)7
28	(l)4,(r)2,l _{1(l)}	(r)5,(r)8,(r)9,0,l _{3(l)}
29	l _{2(l)}	(l)5
30	(r)1	(l)1,(l)6,(r)6,l _{2(l)} ,l _{4(l)} ,l _{5(l)} ,l _{6(l)} ,l _{1(r)} ,l _{3(r)}
31	(r)3,l _{3(l)}	l _{2(r)}
32	(r)4,l _{4(l)}	l ₀
33	(r)5	
34	(l)l ₅ ,l _{2(r)} ,l _{3(r)}	
35	l _{4(r)}	

3.4.5 Teilungsdauer

Die Dauer zur Bildung der ersten e-Reihe ist sehr variabel (n=5) und reicht von 4,9 Stunden bei Embryo C bis 20,5 Stunden bei Embryo A, dessen Teilungsdauer auf die frühe Fehlentwicklung zurückzuführen ist (Embryo A in TABELLE 6). Die beobachteten zweiten Teilungswellen der Ektoteloblasten (n=2) dauerten 7,5 Stunden (Embryo Nr. 6) und 8,0 Stunden (Embryo Nr. 7; beide in TABELLE 6), die der dritten e-Reihe 7,0 Stunden (Embryo Nr. 7) und 7,5 Stunden (Embryo Nr. 6). Aufgrund fehlender Daten kann zum weiteren Teilungsverlauf keine Aussage getroffen werden.

Zusätzlich unterscheiden sich beide Körperseiten eines Tieres in der Dauer der Teilungswellen, welche groß (Embryo B: 10,5 bis 17,0 Stunden links und 12,0 bis 19,5 Stunden rechts) oder klein sein kann (Embryo Nr. 7: 8,5 bis 9,5 Stunden links und 5,5 bis 9,0 Stunden rechts; TABELLE 7). Ab der zweiten Teilungswelle sind innerhalb eines Tieres keine Unterschiede mehr in der Teilungsdauer der rechten und linken Ektoteloblasten feststellbar (TABELLE 7).

TABELLE 6: Dauer für die Bildung der ersten drei e-Reihen (el, ell, elll). Dargestellt sind diese für fünf der elf Embryonen (A, B, C, Nummer 6 und Nummer 7). h = Stunde; „-“ = unvollständige Dokumentation.

Embryo	A	B	C	6	7
el	20,5 h	14,0 h	4,9 h	8,5 h	5,0 h
ell	-	-	-	7,5 h	8,0 h
elll	-	-	-	7,5 h	7,0 h

3. ERGEBNISSE

Tabelle 7: Übersicht der Teilungsdauer (in Stunden) aller Ektoteloblasten von allen Embryonen (A-C und Nummer 1-8) mit Mittelwerten. ET = Ektoteloblast; MWT = Mittelwert; „-“ = fehlender Wert; links und rechts zeigen den Mittelwert für die jeweilige Körperseite für jeden Embryo einzeln. Embryo A zeigt durch deutlich abweichende Werte bei der Teilungsdauer der Ektoteloblasten voraussichtlich eine frühe Fehlentwicklung.

Bildung der zweiten e-Reihe (eII)												Bildung der dritten e-Reihe (eIII)												Bildung der vierten e-Reihe (eIV)											
ET	A	B	C	1	2	3	4	5	6	7	8	A	B	C	1	2	3	4	5	6	7	8	A	B	C	1	2	3	4	5	6	7	8		
0	23,0	12,5	8,7	-	-	-	-	-	9,5	9,0	9,5	-	-	-	-	-	-	-	-	9,0	6,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,5	-		
l1	20,3	15,0	9,2	-	-	-	-	-	10,5	9,0	11,5	-	8,0	-	-	-	-	-	-	9,0	7,5	8,5	-	-	-	-	-	-	-	-	10,5	7,5	-		
l2	23,0	14,5	9,6	-	-	-	-	-	10,5	9,5	12,0	-	8,5	-	-	-	-	-	-	9,0	4,5	8,5	-	-	-	-	-	-	-	-	11,0	10,5	-		
l3	23,5	15,0	9,3	-	-	-	-	-	11,0	9,0	11,5	-	8,0	-	-	-	-	-	-	9,5	7,5	8,5	-	-	-	-	-	-	-	-	11,0	7,5	-		
l4	22,5	17,0	9,1	-	-	-	-	-	11,5	8,5	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	9,5	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,5	-	-		
l5	24,3	12,0	8,9	-	-	-	-	-	10,5	9,0	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	10,5	7,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14,0	8,0	-		
l6	21,5	10,5	8,7	-	-	-	-	-	-	9,0	12,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,5	-		
l7	-	10,5	8,6	-	-	-	-	-	-	-	12,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
l8	-	-	9,0	-	-	-	-	-	-	-	13,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
l9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
r1	27,8	12,5	8,8	-	-	-	-	-	9,5	6,5	11,0	-	7,5	-	-	-	-	-	-	10,0	7,5	9,5	-	-	-	-	-	-	-	-	11,0	-	-		
r2	-	19,5	8,8	-	-	-	-	-	11,5	8,5	11,5	-	9,5	-	-	-	-	-	-	9,5	4,5	9,0	-	-	-	-	-	-	-	-	11,5	7,5	-		
r3	-	15,5	8,6	-	-	-	-	-	10,5	5,5	11,0	-	8,5	-	-	-	-	-	-	10,0	9,0	8,5	-	-	-	-	-	-	-	-	13,0	7,5	-		
r4	-	14,5	-	-	-	-	-	-	11,0	9,0	11,5	-	8,0	-	-	-	-	-	-	10,0	15,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,5	-	-		
r5	-	13,0	-	-	-	-	-	-	11,0	8,0	12,0	-	-	-	-	-	-	-	-	11,0	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12,5	8,5	-		
r6	-	12,0	-	-	-	-	-	-	12,5	9,0	13,5	-	-	-	-	-	-	-	-	11,0	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,5	-		
r7	-	14,0	-	-	-	-	-	-	-	8,5	12,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,5	-		
r8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,0	11,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6,0	-		
r9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4,5	-		
MWT																																			
links	22,5	13,5	9,1	-	-	-	-	-	10,8	9,0	12,2	-	8,2	-	-	-	-	-	-	9,5	7,0	8,5	-	-	-	-	-	-	-	-	11,6	8,2	-		
rechts	-	14,4	8,7	-	-	-	-	-	11,0	7,9	11,8	-	8,4	-	-	-	-	-	-	10,3	8,2	9,0	-	-	-	-	-	-	-	-	12,1	6,6	-		

3.5 Zellen nicht-ektoteloblastischen Ursprungs

3.5.1 Formierung der Reihen A und B (E-Reihen)

Noch vor Beginn der Gastrulation entstehen im Embryo A aus einer Mutterzelle (dunkelbraun markiert) eine Zelle der Reihe AB (hellgrau markiert) und ein Ektoteloblast (rot markiert; ABBILDUNG 10 A, C; Aufnahme 3, jeweils zweimal bei 1 s und 2 s, 15 s, 18 s sowie 21 s). Dabei ordnen sich die Zellen der Reihe AB anterior der Ektoteloblasten an, befinden sich jedoch nicht direkt vor diesen. Die Zellen der Reihe AB zeigen zunächst keine erkennbare Ordnung und sind von geringer Anzahl (ABBILDUNG 10 A).

In der Aufnahme 1 von Hejzol (2002; in dieser Arbeit Embryo D) ist nur ein kleiner Ausschnitt der rechten Körperseite eines sich entwickelnden Embryos dokumentiert. Genauso wie in Embryo A teilen sich insgesamt fünf Zellen in je eine Zelle der Reihe AB (hellgrau markiert) und einen Ektoteloblasten (rot markiert; Aufnahme 8, 46 s bis 1 min 7 s). Da es sich jedoch nur um einen Ausschnitt handelt, könnte die Anzahl der Zellen, die sich in eine Zelle der Reihe AB und einen Ektoteloblasten teilen, auch größer als im Embryo A sein.

Mit Einsetzen der Gastrulation beginnen die Zellen der Reihe AB sich zu teilen und in zwei Reihen (Reihen A und B) anzuordnen (Aufnahme 3, 13 s bis 25 s; Aufnahme 5, 4 s bis 9 s). Dieser Prozess ist vor der Bildung der ersten e-Reihe (el) und mit Schließen des Gastrulationsporus weitestgehend abgeschlossen (ABBILDUNG 12 B).

Dabei finden die Teilungen auf einer Körperseite früher statt als auf der Anderen (ABBILDUNG 12 B, C). Durch fortlaufende Teilungen der Blastodermzellen entstehen weitere Zellen der Reihen A und B (Aufnahme 3, 26 s und 32 s).

Die medianen Zellen der Reihe AB (AB_0) bzw. A und B (A_0 und B_0) bilden später einen Teil der Mittellinie (siehe z.B. Aufnahme 3, 46 s) und werden im KAPITEL 3.5.3 separat beschrieben.

3.5.2 Zellteilungen in der Reihe AB

Nicht jede Zelle in der Reihe AB teilt sich während der Gastrulation in eine Zelle der Reihen A und B. Wie bei den Ektoteloblasten dominiert eine Körperseite während der Zellteilungen, jedoch unterscheidet sich diese in den verschiedenen Embryonen (TABELLE 8).

Ein Großteil der Teilungsspindeln sind dabei orthogonal zur Reihe AB ausgerichtet, während dieser in manchen Zellen in einem 45° Winkel (z.B. die Zelle (l)₁ im Embryo A; Aufnahme 3, bei 16 s) oder parallel zur Reihe AB orientiert ist (z.B. die Zellen (r)₃ und (r)₄ im Embryo A sowie (l)₆ und (r)₆ im Embryo B in Aufnahme 5, 9 s bis 10 s; TABELLE 8).

Weder die Reihenfolge noch das Zeitintervall zwischen den Teilungen sind konstant. So konnten sowohl geordnete Teilungen von innen nach außen (Embryo B; TABELLE 8;

Tabelle 9; siehe ABBILDUNG A23 B) als auch Teilungen ohne erkennbares Muster beobachtet werden (Embryo A und C in TABELLE 8).

Die typische gitterartige Anordnung der Reihen A und B entwickelt sich erst mit der Bildung der zweiten e-Reihe (ell). Erst nachdem die Zellen der Reihe AB ihre Teilung beendet und sich zusätzlich Abkömmlinge des Blastoderms in die Reihe A angeordnet haben (Embryo A: (r)A₃ und (r)A₄; Embryo C: (l)A₁ und (r)A₆ in Aufnahme 7, 3 min 47 s und 5 min 52 s; TABELLE 8), beginnt die Teilung der entstandenen Reihen A und B (TABELLE 8). Nur wenige zusätzliche Zellen konnten beobachtet werden, die sich aus dem Blastoderm in die Reihe A einreihen (mit Sternchen markierte Zellen in TABELLE 8). Aufgrund fehlender Daten zur weiteren Anordnung der Reihen A und B kann keine Aussage getroffen werden, ob sich auch in Reihe B zusätzliche Zellen aus dem Blastoderm anordnen. Die anschließenden Zellteilungen in den Reihen A und B sind für weitere Analysen nicht ausreichend dokumentiert und infolgedessen nicht Bestandteil dieser Arbeit.

TABELLE 8: Reihenfolge der Zellteilungen in den AB- bzw. A- und B-Reihen (unvollständig) bei den Embryonen A, B und C. Die Körperseite ist durch (l) (links) oder (r) (rechts) angegeben und die Position der Zelle ist wie bei den Ektoteloblasten von innen nach außen durchnummeriert, die Reihen A und B tragen zusätzlich ihre Reihenzugehörigkeit im Namen (z.B. (r)A4). „a“ kennzeichnet die anteriore Zelle nach einer mitotischen Teilung; „p“ markiert die posteriore Zelle nach einer mitotischen Teilung; Fett und kursiv sind jene Zellen markiert, deren Teilungen in einem 45° Winkel erfolgen, Fett und unterstrichen jene Zellen, deren Teilungen parallel zur Reihe AB ausgerichtet sind und mit einem „*“ markiert sind Abkömmlinge des Blastoderms, die sich in die Reihen A und B einordnen. Das Teilungsmuster der Reihe AB und Reihen A und B wurde für alle elf Embryonen (nach ABBILDUNG 13) für beide Körperseiten getrennt betrachtet, siehe ABBILDUNG A23 im KAPITEL 6.4.

Embryo	A		B		C	
Abfolge	Reihen AB, A und B	Zeitpunkt (in min)	Reihen AB, A und B	Zeitpunkt (in min)	Reihen AB, A und B	Zeitpunkt (in min)
1	(l)5	1.365	(l)A6 *	1.650	0	104
2	(l)4	1.590	(r)1	1.680	(r)7	1.281
3	(l)2	1.620	(l)5	1.740	(l)A1 *	1.322
4	(l)6,(r)2	1.635	(l)1	1.800	(l)4	1.422
5	<u>(l)1</u>	1.710	(l)2	1.830	(l)3	1.440
6	(l)7	1.725	(l)3	1.860	(l)5	1.443
7	(r)5	1.845	(l)4,(r)2,(l)A0	1.890	(l)8	1.448
8	<u>(r)4</u>	1.890	(r)3,(r)4,(r)0	1.920	(l)2,(r)6	1.472
9	(r)A4 *	1.935	<u>(r)6</u>	1.980	(r)2	1.481
10	(r)A3 *	1.950	<u>(l)6</u>	2.040	(r)1	1.490
11	<u>(r)3</u>	2.055	(l)8	2.160	(r)3	1.536
12	(l)3	2.100	<u>(r)5</u>	2.190	(l)7	1.539
13	0	2.760	<u>(l)A5</u>	3.180	<u>(l)1</u>	1.547
14	<u>(l)A5</u>	2.910	(l)B5	3.210	(l)6	1.551
15	<u>(l)A4</u>	3.150	<u>(l)A6</u>	3.240	(r)5	1.560
16	<u>(l)A6</u>	3.225	(l)A2,(l)A3,(l)B3	3.270	(r)4	1.602
17	(r)A1	3.330	(l)A4	3.300	<u>A0</u>	1.628
18	(l)A2, <u>(l)B5</u>	3.375			<u>B0</u>	1.749
19	(l)A1	3.465			(r)A6 *	2.099
20	(l)B4	3.480			(l)A6	2.199
21	<u>(l)B2</u>	3.555			(l)B4	2.241
22	(l)B1	3.570			(l)A5	2.246
23	<u>(l)A3</u>	3.660			(l)A4	2.249
24	<u>(l)B3</u> , (l)B7	3.765			(l)A3	2.261
25	(l)B6, <u>(r)A2</u>	3.840			<u>(l)A8</u> , <u>(l)B3</u>	2.264
26	(l)A4p	3.930			<u>(l)A9</u>	2.270
27	<u>(r)B3</u>	3.960			(l)B5,(l)B8	2.288
28	<u>(l)B7a</u> , (r)B1	4.170			(r)B6	2.289
29	<u>(r)A4</u>	4.365			A0a	2.292
30	<u>(l)A3p</u>	4.590			(r)A7	2.300
31	(r)A3	4.710			(l)A1,(r)A1	2.301
32					(r)A4	2.330
33					(l)A2	2.348
34					(r)A5	2.349
35					(l)B7	2.351
36					(r)B2	2.367
37					(r)A3	2.370
38					(l)B6	2.376
39					(l)A1p	2.381
40					(r)B5	2.391
41					(l)B2	2.409
42					B0a	2.417
43					(r)B4	2.418
44					<u>(l)B1</u>	2.436
45					(r)B3,B0p	2.442

TABELLE 9: Teilungsabfolge der Zellen der Reihe AB. Die Teilung der Reihe AB aus TABELLE 8 wurde mit den Daten der Embryonen 1 bis 8 ergänzt. Fett sind die AB-Zellen der linken Körperseite, unterstrichen die der rechten. Gelb und grau hinterlegt ist die mittlere Zelle der Reihe AB (AB₀); (m) = mittlere Zelle der mittleren Zellen der Reihe AB; * = blastodermalen Ursprungs.

Embryo	A	B	C	1	2	3	4	5	6	7	8
AB	(l)5	(r)1	0	(l)9	(l)4	(r)5	(r)7	(r)9	(l)3	(r)4	(r)2
	(l)4	(l)5	(r)7	(r)2,(r)4	(l)1,(l)2	(r)0	(r)6		(l)0	(l)6	(l)1
	(l)2	(l)1	(l)4	(r)5	(r)0	(r)6	(l)1		(r)0	(l)4	(l)2,(r)2*
	(l)6,(r)2	(l)2	(l)3	(l)1,(r)1	(l)3	(l)0				(l)1	(r)1
	(l)1	(l)3	(l)5	(l)2	(l)0				(l)0,(r)0		(l)3
	(l)7	(l)4,(r)2	(l)8	(l)3,(l)4							(l)6,(r)4
	(r)5	(r)3,(r)4,0	(l)2,(r)6	(l)5,(l)7							(r)5,0
	(r)4	(r)6	(r)2	(l)8							(l)7,(r)8
	(r)3	(l)6	(r)1	(l)0							(l)4
	(l)3	(l)8	(r)3	(r)0							(r)0,(m)0
	0	(r)5	(l)7								(l)5,(l)0
			(l)1								(r)9
			(l)6								
			(r)5								
			(r)4								

3.5.3 Zellen, die Teile der späteren Mittellinie bilden

Bereits in der frühen Keimscheibe reihen sich im äußeren Halbkreis Zellen ein, die Teile der späteren Mittellinie bilden (gelb markiert; ABBILDUNG 10 A, B). Ihre Anzahl variiert zwischen den Embryonen, jedoch sind es nie weniger als zwei (zwei in Embryo A, drei in Embryo B und vier in Embryo 8, ABBILDUNG 14 A-C). Kurz vor Beginn der ektoteloblastischen Aktivität, also wenn der Gastrulationsporus geschlossen und die Reihe der Ektoteloblasten begründet ist, wandern Zellen, die einen Teil der späteren Mittellinie bilden, nach anterior zwischen die Zellen der Reihen A und B, ordnen sich im Bereich der Mittellinie an und teilen sich einmal, wobei einer der Abkömmling weiter anterior liegt als der Andere (Aufnahme 3, 20 s bis 26 s, ABBILDUNG 14

D-F). Dabei ist weder die Anordnung ihrer Abkömmlinge an der Mittellinie noch deren Anzahl festgelegt. Die Abkömmlinge ordnen sich innerhalb der Reihen A und B als A_0 und B_0 an (ABBILDUNG 14 D-F) oder bilden zwei Zellsäulen, womit sie rechts oder links der Mittellinie an der Bildung der mittleren Zellen der Reihen A und B beteiligt sind (A_1 und B_1 ; ABBILDUNG 14 D-F). Sie teilen sich im weiteren Verlauf der Embryogenese noch mindestens zweimal. Ihre Derivate ordnen sich dann nicht mehr nur im Bereich der Reihen A und B an, sondern wandern zum Teil auch nach anterior und sind an der Bildung des nauplialen bzw. des anterioren Teils des postnauplialen Bereichs beteiligt (ABBILDUNG 14 F). Ein einheitliches Muster zwischen den Embryonen konnte nicht erkannt werden.

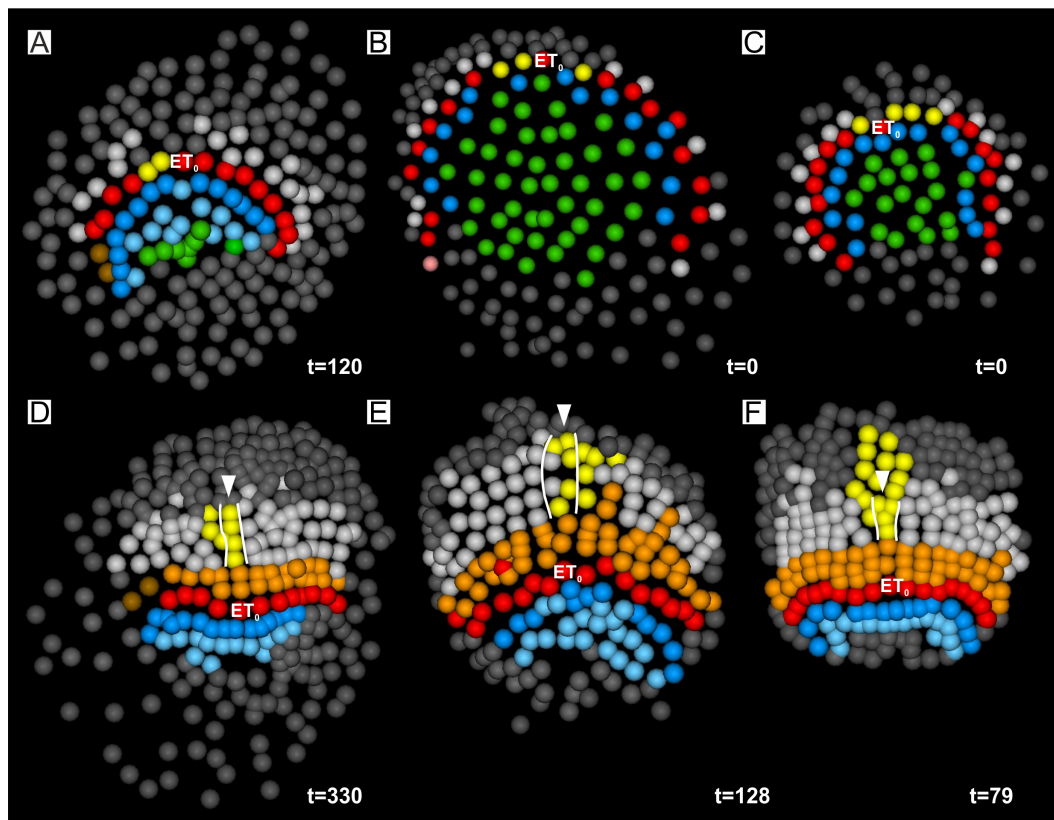


ABBILDUNG 14: 3D Viewer Darstellungen dreier Embryonen im Vergleich. A, B und C zeigen die Keimscheibe mit dem Halbkreis der Ektoteloblasten (rot). **D, E und F** zeigen die Embryonen während der Keimstreifverlängerung; die weißen Linien und Pfeilköpfe markieren die Mittellinie. (**A, D**) Embryo A bei $t=120$ (1.800 min) und $t=330$ (4.950 min); (**B, E**) Embryo B bei $t=0$ (0 min) und $t=128$ (3.840 min); (**C, F**) Embryo Nr. 8 bei $t=0$ (0 min) und $t=79$ (2.370 min). Grün = Mesentoderm; Blau = innerer Halbkreis; Hellblau = Derivate des inneren Halbkreises; Braun = teilt sich nicht mehr, ist jedoch Teil der Reihe der Ektoteloblasten; Dunkelbraun = teilen sich noch einmal in einen Ektoteloblasten und eine Zelle der Reihen A und B; Rot = Ektoteloblasten; Orange = e-Reihen; Rosa = teilt sich in zwei Ektoteloblasten; Gelb = Zellen, die einen Teil der Mittellinie bilden; Hellgrau = Zellen der Reihen A und B (E-Reihen); Dunkelgrau = restlichen Zellen der Keimscheibe. Der mittlere Ektoteloblast (ET_0) dient als Referenzpunkt.

3.6 Formierung der Zellen des inneren Halbkreises

Zwischen Gastrulationszentrum und der Reihe der Ektoteloblasten befinden sich Zellen, die sich während der Gastrulation mehrfach teilen und ebenfalls in einem Halbkreis angeordnet sind (innerer Halbkreis; blau markiert; ABBILDUNG 15 A). Weil die Zellen des inneren Halbkreises schon in der frühen Keimscheibe erkennbar sind, können sie zur Identifizierung der Ektoteloblasten herangezogen werden. Mindestens zweimal teilen sich die Zellen des inneren Halbkreises äqual, wobei dieser erhalten bleibt und die Tochterzellen den Gastrulationsporus umwachsen (siehe hellblaue Zellen in ABBILDUNG 15 B). Die Zellen des inneren Halbkreises sind in allen Embryonen anfangs leicht nach anterior konvergierend angeordnet und die Teilungswelle verläuft ähnlich wie bei den Ektoteloblasten von innen nach außen, wenn auch weniger deutlich (ABBILDUNG 15; Aufnahme 3, 0 s bis 28 s). Dabei setzen jedoch vereinzelt Zellen des inneren Halbkreises die Teilung aus, die erst zu einem späteren Zeitpunkt nachgeholt wird (ABBILDUNG 15 B; z.B. rechte Körperseite in Aufnahme 3, 9 s bis 14 s). Dadurch entsteht der Eindruck, dass die Teilungstätigkeit des inneren Halbkreises an der Verlängerung des Keimstreifens hinter dem Halbkreis der Ektoteloblasten bis zum Gastrulationsporus maßgeblich beteiligt ist.

Die finale Anzahl der Zellen des inneren Halbkreises ist ähnlich wie bei den Ektoteloblasten zu Beginn der Gastrulation noch nicht erreicht, sondern wird erst durch weitere mitotische Teilungen parallel zum inneren Halbkreis erhöht (Kreuz markierte Zellen in ABBILDUNG 15 B). Dabei unterscheidet sich die Anzahl der Zellen des inneren Halbkreises zwischen den verschiedenen Embryonen (ABBILDUNG 14, A: $n=14$, B: $n=15$, C: $n=16$). Am Ende der Gastrulation bewegen sich die medialen Zellen zusammen mit den Tochterzellen, die in keiner definierbaren Reihenfolge entstehen, nach posterior, sodass die Zellen des inneren Halbkreises nun in einer geraden Linie angeordnet sind und dichter zusammen liegen (ABBILDUNG 14 D; Aufnahmen 2 und 3, beide 20 s bis 25 s; Aufnahme 4 und 5, beide 6 s bis 11 s). Nach Schließen des Gastrulationsporus und damit dem Ende der Gastrulation teilt sich der

innere Halbkreis ein zweites Mal und erhöht somit die Zelldichte. Diese Verdichtung wird durch nachfolgende Teilungen der Abkömmlinge zusätzlich verstärkt (Aufnahme 3, 28 s bis 43 s). Die mittleren Ektoteloblasten werden durch das Zusammenspiel aus dem sich schließenden Gastrulationsporus, der ersten Teilungswelle des inneren Halbkreises und der Verlagerung der medialen Zellen des inneren Halbkreises sukzessive nach posterior gedrängt, in dessen Folge sich die Reihe der Ektoteloblasten ebenfalls in einer geraden Linie anordnet (vgl. ABBILDUNG 14 B mit E sowie C mit F; Aufnahme 3, 17 s bis 26 s).

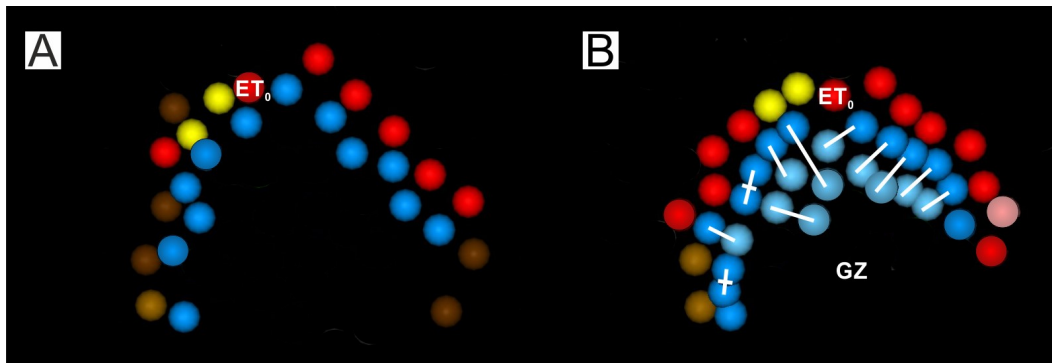


ABBILDUNG 15: Teilungsaktivität der Zellen des inneren Halbkreises im Embryo A. **A:** vor der Teilungsaktivität des inneren Halbkreises (blau markiert; bei $t=0$, 0 min); **B:** Die erste Teilungswelle des inneren Halbkreises ($t=95$, 1.425 min), weiße Linien markieren die beiden Tochterzellen einer Mutterzelle; ein Kreuz markiert die Zellen, die sich parallel zum inneren Halbkreis teilen. Blau = innerer Halbkreis; Hellblau = Derivate des inneren Halbkreises; Braun = teilt sich nicht mehr, ist jedoch Teil der Reihe der Ektoteloblasten; Dunkelbraun = teilen sich noch einmal in einen Ektoteloblasten und eine Zelle der Reihen A und B; Rot = Ektoteloblasten; Rosa = teilt sich in zwei Ektoteloblasten; Gelb = Zellen, die Teile der Mittellinie bilden; ET_0 = medianer Ektoteloblast, GZ = Gastrulationszentrum.

3.7 Synchronisation zwischen den Zellgruppen

Um eine Synchronisation zwischen den analysierten Zellgruppen vornehmen zu können, wurden die Rohdaten der Zellzählungen (ABBILDUNG 16 A) erst moduliert (ABBILDUNG 16 B) und dann schematisiert (ABBILDUNG 16 C). Anschließend konnten die so entstandenen Zellzahl-Zeitverlaufs-Diagramme für die Embryonen A, B und C miteinander verglichen werden (ABBILDUNG 17). Da der innere Halbkreis bereits in der frühen Keimscheibe identifizierbar ist, ein

ähnliches Teilungsverhalten zum Halbkreis der Ektoteloblasten aufweist (siehe KAPITEL 3.6) und während der gesamten Entwicklung als solcher erkennbar bleibt, obwohl die Teilungen des inneren Halbkreises äqual erfolgen, wurde dieser ebenfalls in die Auswertung mit einbezogen.

Die ersten dokumentierten Zellteilungen finden im inneren Halbkreis statt. Sie beginnen noch vor der Gastrulation (ABBILDUNG 17, A: bei $t=15$ min; C: zwischen den Zeitpunkten 2 und 202). Während der Gastrulation erfolgen wenige Zellteilungen innerhalb der mesentodermalen Zellen, die in Intervallen im Gastrulationsporus einsinken (erkennbar am stufenförmigen Kurvenverlauf im Zellzahl-Zeitverlaufs-Diagramm, ABBILDUNG 17 A). Während der Gastrulation teilen sich die Zellen des inneren Halbkreises und beginnen bereits mit der nächsten Teilung. Zeitgleich bilden die Zellen der Reihe AB die Reihen A und B aus (ABBILDUNG 17, A: bei $t=1.815$ min). Alle übrigen Zellgruppen, wie z.B. die Ektoteloblasten, sind während der Gastrulation teilungsinaktiv, sodass deren Zellzahl konstant bleibt. Wenn die Gastrulation abgeschlossen ist, sprich die mesentodermalen Zellen abgetaucht sind und der Gastrulationsporus geschlossen ist, teilen sich die Zellen, die Teile der künftigen Mittellinie bilden (gelbe Kurven links von der Hilfslinie in ABBILDUNG 17, A: bei $t=2.715$ min und C: bei $t=2.202$ min). Eine Ausnahme bildet der Embryo B, dessen Ektoteloblasten bereits während Gastrulation mit ihrer Teilungsaktivität beginnen (ABBILDUNG 17 B).

Mit dem Ende der Gastrulation sind beide Halbkreise vollständig etabliert. Dabei sind vereinzelte individuelle Verzögerungen bei der Bildung der Ektoteloblasten möglich (ABBILDUNG 17 A, C). In der Regel wird jedoch die Reihe AB im Verlauf der Gastrulation vervollständigt und die erste mitotische Teilung, bei der die Reihen A und B gebildet werden, beginnt (ABBILDUNG 17, A: bei $t=1.815$ min und B: bei $t=1.830$ min). Vor Beginn der Teilungsaktivität der Ektoteloblasten „ruht“ der Embryo und es sind keine weiteren Zellteilungen feststellbar (kurzes Plateau vor der Hilfslinie bei Embryo A und C in ABBILDUNG 17).

Mit dem Einsetzen der ektoteloblastischen Teilungsaktivität nehmen die Zellteilungen im Embryo wieder stark zu (blaue gestrichelte Hilfslinie in ABBILDUNG 17). Während die Reihe der Ektoteloblasten die erste e-

Reihe (el) bildet, beginnt beinahe zeitgleich die dritte Teilung des inneren Halbkreises (vgl. orange und hellblaue Linien rechts der Hilfslinie in ABBILDUNG 17). Auch die Zellen nicht-ektoteloblastischen Ursprungs nehmen nur wenig später ihre Teilungsaktivität wieder auf (ABBILDUNG 17, A: bei $t=3.615$ min; C: bei $t=3.002$ min). Die Zellen, die Teile der späteren Mittellinie bilden, beenden dagegen ihre mitotische Teilungsaktivität im Bereich der Reihen A und B und markieren den Startpunkt der zweiten Teilung der Ektoteloblasten (Bildung der zweiten e-Reihe (eII)) (ABBILDUNG 17, A: bei $t=4.515$ min; B: zwischen den Zeitpunkten 3.030 min und 3.630 min; C: zwischen den Zeitpunkten 3.002 min und 3.202 min).

Die finale Zellzahl des inneren Halbkreises erhöht sich bei den Embryonen A, B und C in zwei Intervallen und ist ähnlich wie bei den Ektoteloblasten mit Beginn der Gastrulation fast erreicht, wobei sich nur vereinzelte Zellen des inneren Halbkreises parallel zum Halbkreis teilen (z.B. mit Kreuz markierte Zellen in ABBILDUNG 15 B). Die erste Zunahme der Zellzahl (erstes Intervall) erfolgt vor oder während der Gastrulation, wenn die Zellen des inneren Halbkreises die erste Teilungswelle absolvieren (ABBILDUNG 17, A: zwischen den Zeitpunkten 1.215 min und 1.515 min; B: zwischen den Zeitpunkten 630 min und 1.230 min; C: bei $t=202$ min). Das zweite Intervall erfolgt vor Beginn der zweiten Teilungswelle des inneren Halbkreises (ABBILDUNG 17, A: zwischen den Zeitpunkten 1.215 min und 1.515 min; B: zwischen den Zeitpunkten 1.830 min und 2.430 min) oder während seiner dritten Teilungswelle (ABBILDUNG 17, C: bei $t=3.002$ min). Die übrigen Zellen des inneren Halbkreises, die sich nicht parallel zum Halbkreis teilen, vollziehen unterdessen die Teilungswellen, wie bereits in KAPITEL 3.6 beschrieben.

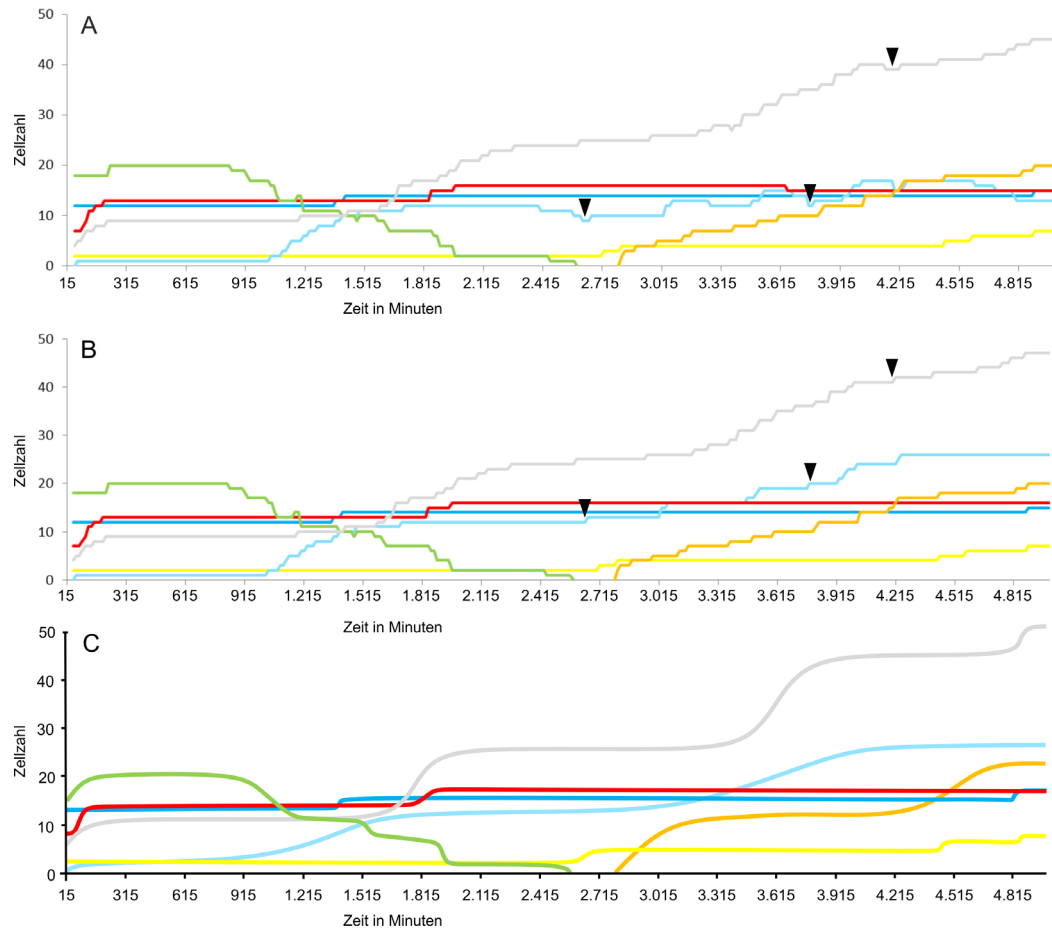


ABBILDUNG 16: Zellzahl-Zeitverlaufs-Diagramm entsprechend der verschiedenen Zellschicksale für Embryo A. **A:** zeigt das reale Diagramm basierend auf Zählungen. Zellabnahmen resultieren aus der Qualität der Dokumentation und methodisch bedingten Artefakten; **B:** zeigt das modulierte Diagramm, bei dem die Zellen, die aufgrund der Bildqualität nicht mehr zu verfolgen sind, dennoch als vorhanden gewertet wurden (Pfeilköpfe markieren den veränderten Kurvenverlauf). Ausgenommen sind die Zellen des späteren Mesentoderms, deren Einwanderung den Prozess der Gastrulation darstellt; **C:** zeigt das Diagramm schematisiert mit vereinfachtem Kurvenverlauf. Grün = Zellzahl der einwandernden mesentodermalen Zellen (Gastrulation); Blau = Zellzahl des inneren Halbkreises; Hellblau = Zellzahl der Abkömmling des inneren Halbkreises; Rot = Zellzahl der Ektoteloblasten; Orange = Zellzahl der e-Reihen; Gelb = Zellzahl der Zellen, die einen Teil der Mittellinie bilden; Hellgrau = Zellzahl der Reihe AB bzw. Reihen A und B (E-Reihen).

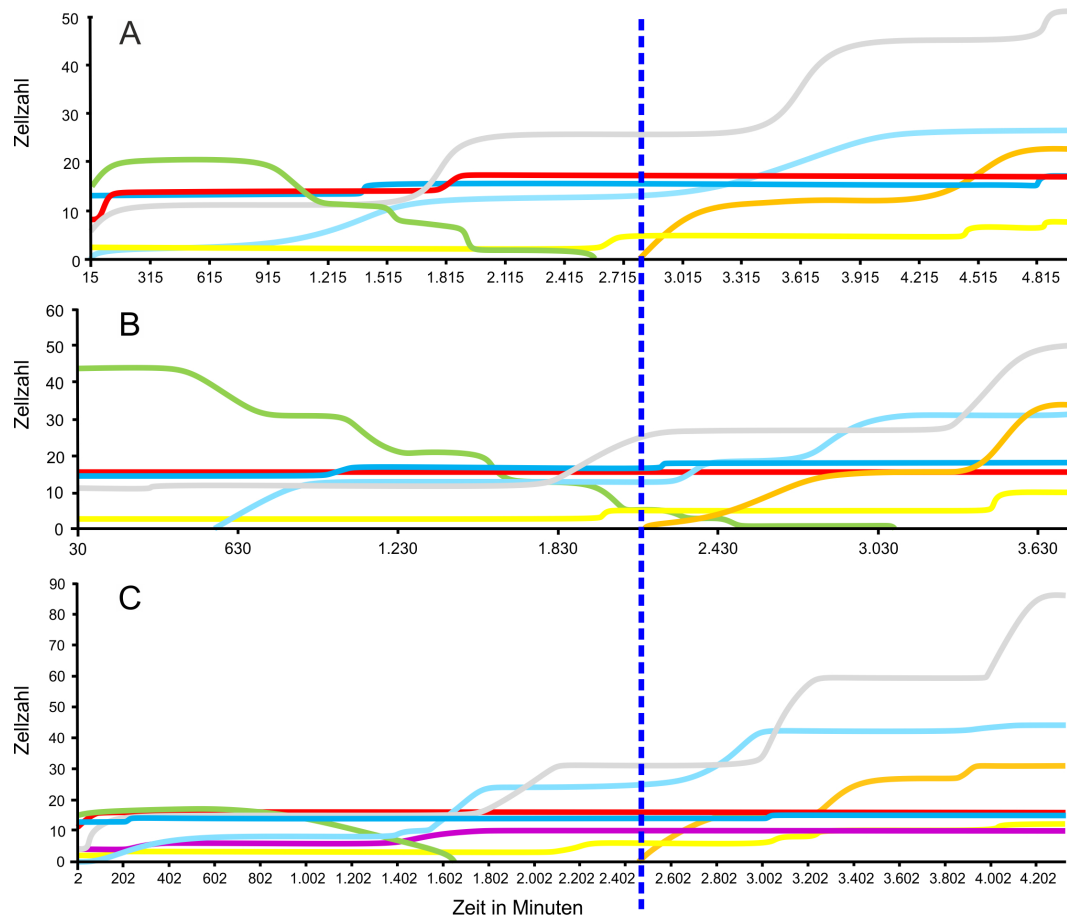


ABBILDUNG 17: Schematisierte Zellzahl-Zeitverlaufs-Diagramme für drei Embryonen im Vergleich. A: Embryo A; **B:** Embryo B; **C:** Embryo C, die lila-farbene Linie repräsentiert Zellen, deren Zellschicksal bei Embryo C nicht eindeutig bestimmt werden konnte. Die blau gestrichelte senkrechte Linie markiert den Beginn der ektoteloblastischen Teilungsaktivität (orange-farbene Linie). Grün = Zellzahl der einwandernden mesentodermalen Zellen (Gastrulation); Blau = Zellzahl des inneren Halbkreises; Hellblau = Zellzahl der Abkömmlinge des inneren Halbkreises; Rot = Zellzahl der Ektoteloblasten; Orange = Zellzahl der e-Reihen; Gelb = Zellzahl der Zellen, die einen Teil der Mittellinie bilden; Hellgrau = Zellzahl der Reihe AB bzw. Reihen A und B (E-Reihen).

4. DISKUSSION

4.1 Bedeutung der Zellmarkierung zur Untersuchung der Gastrulation

Für viele Arten der Crustacea ist die Bildung der Keimblätter (Gastrulation) von Anderson (1973) vergleichend und umfassend dargestellt worden. Dabei ist jedoch zu bemerken, dass er nur vereinzelt auf Taxa genauer eingeht, um deren Besonderheiten hervorzuheben. Bei den Beschreibungen zu den Malacostraca („Höhere Krebse“) beschränkte er sich dabei größtenteils auf die Decapoda, während die Peracarida im geringeren Maße beleuchtet wurden. Gerberding und Patel (2004) verglichen als Erste die Gastrulation bei Crustaceen und stellten die Gastrulation der Malacostraca der Gastrulation der Nicht-Malacostraca gegenüber (Phylogenie der Malacostraca siehe ABBILDUNG 18 nach Schwentner et al., 2018). Dabei nehmen sie an, dass die Gastrulation bei Isopoden ein Mix aus Immigration, Invagination und Delamination ist. Hejnal (2002) untersuchte als Erster *in vivo* die frühe Entwicklung von *Porcellio scaber* und konnte während der Gastrulation neben der Immigration und der Delamination auch das Abdrängen von Zellen beobachten, wobei dennoch die Immigration den Hauptprozess darstellt und durch die Delamination unterstützt wird. Das wurde auch schon von Vehling (1994) in einer umfassenden Arbeit zur Entwicklung des postnauplialen Keimstreifens von *Porcellio scaber* beschrieben.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden nun die ersten Zellmarkierungen bei *Porcellio scaber* durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich der Zellverband am zukünftigen Gastrulationsporus auflockert und eine temporäre „Furche“ bildet, bevor die Immigration stattfindet und den Gastrulationsporus bildet. Ein derartiges Verhalten der Zellen im Gastrulationszentrum haben weder McMurrich (1895), Vehling (1994) noch Hejnal (2002) bei der Kellersassel beschrieben. Weiterhin zeigen die vorliegenden Daten, dass Zellwanderungen im Gastrulationszentrum auftreten, die durch Zellteilungen im Randbereich

verstärkt werden. Dabei werden einige Zellen in den Gastrulationsporus abgedrängt und damit die Invagination (Einstülpung) des Gastrulationsporus erzeugt. Eine Delamination konnte dagegen in der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig belegt werden. Die von verschiedenen Autoren als Hauptbewegung genannte Immigration, die bei *Porcellio scaber* die Gastrulation einleitet, konnte auch in der vorliegenden Arbeit bei den Embryonen A, B und C beobachtet werden (Hahnenkamp, 1974; Vehling, 1994; Hejnal, 2002; Milatović et al., 2010). Sie wird durch die Teilungswellen des inneren Halbkreises verstärkt (ABBILDUNG 19 C, D). Beide Prozesse zusammen führen dann zur Bildung des Gastrulationsporus. Milatović et al. (2010) zählten zu den Prozessen der Gastrulation auch die Einstülpung mit hinzu. Diese sollte jedoch nicht als ein Prozess der Gastrulation betrachtet werden, so wie es Milatović et al. (2010) beschrieben haben, sondern eher als eine Konsequenz der Immigration und Abdrängung. Weitere Studien mit anderen Vitalfarbstoffen zur Markierung der Zellmembranen und Zellkerne als die in dieser Studie genutzten Dextrane, die die Zelllumen markieren, sind notwendig, um sowohl die radial ausgerichteten Zellteilungen (Vehling, 1994; Übersichtsartikel Scholtz und Wolff, 2013) als auch das Wanderungsverhalten der Zellen zu überprüfen. Nur so kann untersucht werden, wie die immigrierenden Zellen bei *Porcellio scaber* einwandern.

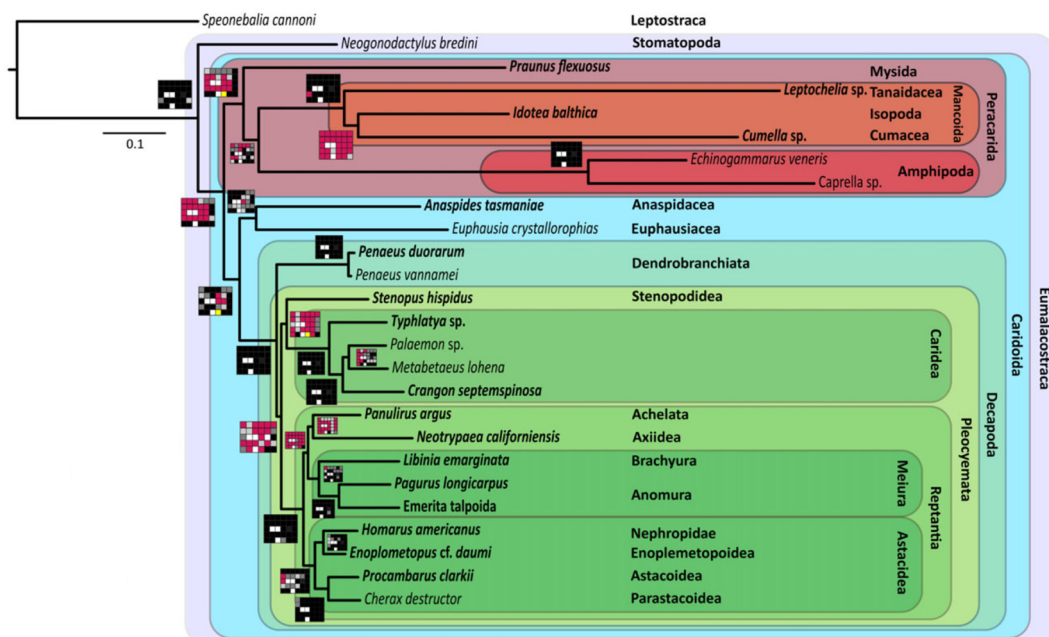


ABBILDUNG 18: Phylogenie der Malacostraca nach Schwentner et al. (2018).

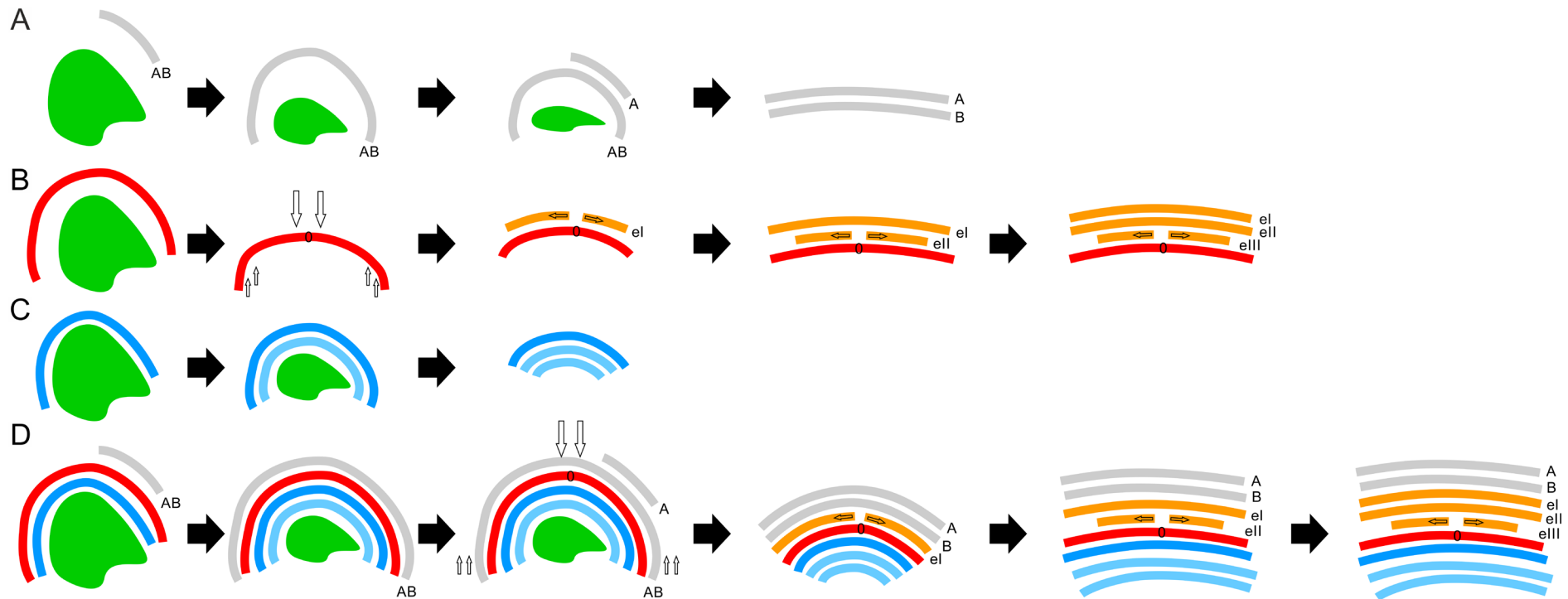


ABBILDUNG 19: Schematische Darstellung der frühen Entwicklung bei der Kelleraassel *Porcellio scaber*. **A:** Die Reihe AB bildet sich anterior der Ektoteloblasten durch die Teilung einer Vorläuferzelle in einen Ektoteloblasten und eine Zelle der Reihe AB, die nach Abschluss der Teilungswelle mit der Bildung der Reihen A und B beginnt; **B:** Durch das Wanderungsverhalten der medialen Ektoteloblasten nach posterior (größere vertikale Pfeile) und der Übrigen nach anterior (kleinere vertikale Pfeile) wird die Reihe der Ektoteloblasten zunehmend begradigt (die Größe der vertikalen Pfeile repräsentiert die Stärke des Wanderungsverhaltens). Dem folgt die Bildung der e-Reihen (el, ell, elll) durch die Teilungstätigkeit der Ektoteloblasten, deren Teilungsfolge von median nach lateral verläuft (gekennzeichnet durch horizontale Pfeile) und die ihre Tochterzellen nach anterior abgeben („0“ markiert den mittleren Ektoteloblasten); **C:** Die Teilungstätigkeit und Begradigung des inneren Halbkreises, der sich bei kleiner werdendem Gastrulationszentrum teilt, dennoch als Halbkreis erhalten bleibt und am Schließen des Gastrulationsporus beteiligt ist; **D:** Kombination der unter A bis C dargestellten Entwicklungsprozesse. Grün = Mesentoderm; Blau = innerer Halbkreis; Hellblau = Derivate des inneren Halbkreises; Rot = Ektoteloblasten; Orange = e-Reihe; Hellgrau = Zellen der Reihen A und B.

4.2 Bildung und Differenzierung der Keimscheibe

In der Arbeit von McMurrich (1895), in der er frühe Stadien der Entwicklung bei *Porcellio scaber* mit *Armadillidium vulgare* (einer anderen Landassel) verglichen hat, kann der Zeitpunkt der Membranbildung nur anhand seiner Zeichnungen abgelesen werden, da er die Bildung erster Zellmembranen zwar erwähnte, die Beschreibung jedoch lückenhaft ist. In seiner Abbildung 47, einem Schnitt durch ein „32-celled stage“ von *Porcellio scaber*, fehlt eine Zellgrenze zwischen den beiden dargestellten Zellkernen, wohingegen in seiner Folgeabbildung, einer Ventralansicht einer sich bildenden Keimscheibe, bereits vier zentral gelegene Zellkerne von Zellmembranen umgeben sind. Ob bereits zu Beginn vier zentrale Zellen von einer Zellmembran umgeben sind, ist in den hier vorliegenden Daten nicht eindeutig erkennbar. Dennoch ist zu beobachten, dass sich die Bildung der Zellmembranen wellenartig nach außen fortsetzt, sodass diese, wie es auch McMurrich (1895) bei *Porcellio scaber* beschrieb, im Zentrum der sich bildenden Keimscheibe begonnen haben muss (vgl. Aufnahme 1). Dabei stellt sich die Frage, ob die Bildung der Zellmembranen auf der dem Dotter zugewandten Seite oder auf der dem Dotter abgewandten Seite der Zellkerne beginnt. Weder mit Hilfe histologischer Schnitte (McMurrich, 1895) noch mit Rasterelektronen-Aufnahmen (Wolff, 2009) konnte diese Frage geklärt werden. Auch mit Hilfe der hier vorliegenden Epifluoreszenz-Daten können die sich bildenden Zellmembranen nur auf der Eioberfläche erkannt werden, sodass die exakte Bildungsweise der Zellmembranen nicht mit Sicherheit geklärt werden kann. Unter Verwendung der Transmissions-elektronenmikroskopie (TEM) oder membranbindender Vitalfarbstoffe kombiniert mit der Lichtblatt-Mikroskopie könnte die Entwicklung der Zellmembranen bis in die Tiefe dokumentiert werden, so wie es z.B. für den Amphipoden *Parhyale hawaiiensis* schon standardmäßig angewendet wird (Kontarakis und Pavlopoulos, 2014; Psycharakis et al., 2014; Clark-Hachtel und Tomoyasu 2017; Kao et al. 2017; Wolff et al., 2018).

Mit der Gastrulation werden alle drei Keimblätter des Embryos „separiert“: Ekto-, Ento- und Mesoderm (Übersichtsartikel Scholtz und

Wolff, 2013). Bei einigen Peracarida-Arten, wie z.B. *Asellus communis*, *Jaera marina* und *Gammarus pulex* (McMurrich, 1895; Weygoldt, 1958; Scholtz, 1990), lassen sich Ento- und Mesoderm erst nach dem Ende der Gastrulation differenzieren, wenn sie als Zellhaufen aus groß- und kleinkernigen Zellen unter dem Blastoderm liegen (Scholtz, 1990). Bereits während der Keimscheibenbildung ist eine Gruppe von Zellen im Zentrum der Keimscheibe als Mesentoderm determiniert, die sich durch mehrere mitotische Teilungen noch vergrößert (McMurrich, 1895; Dohle, 1970). Eine konkrete Anzahl an Teilungen bzw. der daraus resultierenden mesentodermalen Zellen gibt McMurrich (1895) weder für *Porcellio scaber* noch für *Armadillidium vulgare* an. In der vorliegenden Arbeit konnten 21 (Embryo A) bis 44 (Embryo B) mesentodermale Zellen beobachtet werden, bei denen zu Beginn der Gastrulation noch vereinzelte Zellteilungen stattfinden. Folglich könnte sich Embryo B bereits in einem späteren Entwicklungsstand als Embryo A befinden und eine Teilungswelle voraus sein. Ebenso sind jedoch auch methodisch bedingte Ursachen für den deutlichen Unterschied zwischen den beiden Embryonen nicht ausschließbar. So könnte es sich bei einigen Zellen in der Peripherie, die dem Mesentoderm zugeordnet wurden, auch um Abkömmlinge des inneren Halbkreises handeln. Weitere mögliche Erklärungen sind, dass eine innerartliche Variabilität vorliegt, die die Unterschiede in der Anzahl der Zellen des Mesentoderms vor Beginn der Gastrulation, aber auch in der Anzahl der Ektoteloblasten und der Zellen, die Teile der Mittellinie bilden, bei den untersuchten Embryonen erklären könnte (ABBILDUNG 14). Ebenso könnte die Gastrulation bei Embryo A bereits vor Beginn der Dokumentation begonnen haben. Dies hat jedoch alles keinen Einfluss auf die Interpretation der Daten, da die Entwicklung beider Embryonen problemlos synchronisiert und die Teilungsaktivität der beiden Halbkreise beobachtet werden konnten.

4.3 Ektoteloblasten innerhalb der Malacostraca

Teloblasten sind große Stammzellen, die in sich wiederholenden, asynchronen, inäqualen Teilungen Tochterzellen ausschließlich in eine Richtung abgeben (Siewing 1969; Stent, 1985; Dohle und Scholtz, 1997; Dohle et al., 2004) und vor allem für die Malacostraca beschrieben wurden (*Cambaroides japonicus*, Scholtz und Kawai, 2002; *Caridina laevis*, Nair, 1948; *Cherax destructor*, Reichenbach, 1888; Scholtz, 1992; *Crangon vulgaris*, Weldon, 1892; *Cyathura polita*, Strömberg, 1972; *Eupagurus prideauxi*, Scheidegger, 1976; *Hemigrapsus saguineus* und *Pagurus samuelis*, Ōishi, 1960; *Heptacarpus rectirostris*, Ōishi, 1959; *Irona far* und *Irona robusta*, Nair, 1956; *Mesopodopsis orientalis*, Nair, 1939; *Palaemonetes varians*, Weygoldt, 1961; *Sicyonia ingentis*, Hertzler, 2002; *Squilla oratoria*, Shiino, 1942; *Squilla squilla*, Nair, 1941). Im Grundmuster der Malacostraca wird ein geschlossener Zellring aus insgesamt 19 Ektoteloblasten angenommen, der sich innerhalb der „Ranzenkrebse“ (Peracarida) bei den Mysidacea und Mancoida (Tanaidacea, Cumacea, Isopoda) in eine Reihe abgewandelt hat und bei den Amphipoda sogar komplett reduziert wurde (Dohle, 1972; Dohle und Scholtz, 1988; Scholtz und Dohle, 1996; Scholtz, 2000; Dohle et al., 2004; Wolff und Gerberding, 2015). Der bei den Isopoden anfangs stark gebogene Halbkreis wird im Laufe der Embryogenese zu einer Geraden, deren Teilungsaktivität das Zellmaterial für die späteren Segmente bildet (Strömberg, 1971; Hahnenkamp, 1974; Vehling, 1994; diese Arbeit). Anders verhält es sich bei den Amphipoden, bei welchen die Verlängerung des Keimstreifens durch eine Selbstorganisation ektodermaler Zellen in Reihen und Säulen realisiert wird, wodurch letztlich ein vergleichbares Gittermuster wie bei Isopoden und Dekapoden entsteht (Scholtz, 1990; Wolff und Scholtz, 2002; Wolff und Gerberding, 2015).

Innerhalb der Malacostraca verändert sich die Anordnung der vor Beginn der Gastrulation zumeist undifferenzierten Ektoteloblasten von halbkreisförmig, wo oftmals median Ektoteloblasten fehlen (z.B. Syncarida: *Anaspides tasmaniae*, Hickman, 1937; Cumacea: *Diastylis rathkei*, Dohle, 1970; Mysidacea: *Mesopodopsis orientalis*, Nair, 1939),

über eine kurzzeitig ringförmige Anordnung zu einer lückenlosen geraden Reihe (Dohle, 1972). Dabei verlängern sich die beiden Halbreihen der Ektoteloblasten, die zusammen den Halbkreis bilden, und treffen sich anterior des Gastrulationszentrums, wobei sie vorübergehend einen Ring aus Ektoteloblasten bilden, dem ventromedian ein Ektoteloblast fehlt. Diese ventromediane „Lücke“ wird im weiteren Verlauf der Entwicklung bis zur endgültigen Anordnung der Ektoteloblasten in einer geraden Reihe bei verschiedenen Arten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Embryogenese durch einen unpaaren, medianen Ektoteloblasten geschlossen (z.B. gemeinsam mit den übrigen Ektoteloblasten bei den Stomatopoda: *Squilla oratoria*, Shiino, 1942; später als die übrigen Ektoteloblasten bei den Decapoda: *Cherax destructor*, Scholtz, 1992). Auch die Differenzierung Ektoteloblasten (*sensu* Dohle, 1970), d.h. die Ausprägung der zellmorphologischen Merkmale und des teloblastentypischen Teilungsverhaltens, erfolgt bei den verschiedenen Vertretern der Malacostraca zu unterschiedlichen Zeitpunkten (z.B. Manton, 1928, 1934; Ōishi, 1959, 1960; Scholtz, 1984; Scholtz, 1992) und wird im KAPITEL 4.4.3 gesondert behandelt. Bei den Isopoden ist die Anordnung der Ektoteloblasten anterior des sich bildenden Gastrulationsporus hingegen stets gleich (Strömberg, 1971; Hahnenkamp, 1974). Sie liegen immer in einem posterior geöffneten Halbkreis, der mit Beginn der Bildung der ersten e-Reihe zu einer Geraden wird (Strömberg, 1971; Hahnenkamp, 1974; Vehling, 1994; diese Arbeit).

4.4 Bildung der Ektoteloblasten

4.4.1 Phasen der Bildung eines Ektoteloblasten

Dohle (1970) beschrieb zwei Phasen für die Bildung der Reihe der Ektoteloblasten bei *Diastylis rathkei* (Crustacea, Cumacea): die Determinierung und die Differenzierung. Dabei nimmt er für *Diastylis rathkei* an, dass sich die Vorläuferzellen der Ektoteloblasten in zwei Halbreihen um den sich bildenden Gastrulationsporus anordnen und dass

die endgültige Anzahl der Ektoteloblasten vor Beginn ihrer Teilungsaktivität noch nicht erreicht ist (Determinierung). Während die Ektoteloblasten ihre endgültige Anordnung einnehmen, werden sowohl die Zellen als auch ihre Zellkerne größer als bei den übrigen Zellen der Keimscheibe, wodurch die Ektoteloblasten zellmorphologisch erkannt werden können. Zudem teilen sie sich nicht mehr äqual und erreichen ihre finale Anzahl (Differenzierung). Demnach steht bereits ab der ersten Phase für die Zellen der zwei Halbreihen (bzw. des Halbkreises bei Isopoden) das Zellschicksal fest, ein Ektoteloblast zu werden. Wie die Ektoteloblasten dabei ihre finale Anordnung erreichen, wurde bereits in KAPITEL 4.3 kurz diskutiert.

4.4.2 Determinierung der Ektoteloblasten

Die Halbreihen bzw. der Halbkreis fungieren als Determinierungszone für die Ektoteloblasten, in der jede sich anlagernde Zelle als Ektoteloblast festgelegt (determiniert) wird (*in situ* Entstehung) (Dohle, 1970; Strömberg, 1971; Hahnenkamp, 1974; Vehling, 1994; Dohle et al., 2004). Folglich könnte jede Blastodermzelle, die sich am Rand der Halbreihen bzw. des Halbkreises anordnet, ob von anterior, posterior oder lateral kommend, zu einem Ektoteloblasten determiniert werden. Wie Strömberg (1971) vermutete, beruht dabei die vergleichsweise ähnliche Anzahl von Ektoteloblasten bei verschiedenen Isopodenarten vermutlich auf einer vergleichbaren Größe der Determinierungszone trotz unterschiedlicher Eigröße.

Dohle (1970) und Hahnenkamp (1974) nahmen an, dass die Determinierung zeitlich vor der Differenzierung der Ektoteloblasten und nicht synchron erfolgt. Ihrer Meinung nach ist die Determinierungszone in einem deutlich erkennbaren Halbkreis anterior des Gastrulationszentrums zu vermuten und schon vor Beginn der Gastrulation als solche festgelegt. Die hier vorliegenden Daten von *Porcellio scaber* bestätigen die Beschreibung von Dohle (1970), dass die Determinierung eines Ektoteloblasten vor seiner Teilungstätigkeit erfolgt. Darauf weist die

Teilungspause zwischen der Bildung des äußeren Halbkreises und dem Beginn seiner typischen Teilungsaktivität zur Bildung der e-Reihen hin (Plateau in ABBILDUNG 17; Dohle, 1970) sowie der Umstand, dass die Ektoteloblasten erst zum Ende der Bildung der ersten e-Reihe als solche zellmorphologisch erkennbar sind.

4.4.3 Differenzierung der Ektoteloblasten

Innerhalb der Malacostraca existieren für die Mysidacea, die basal abzweigenden Leptostraca und die Decapoda konkrete Angaben zur Differenzierung der Ektoteloblasten (Charakteristika siehe KAPITEL 4.4.1), die in diesen Taxa erst mit Beginn ihrer typischen Teilungstätigkeit festgestellt werden kann (Manton, 1928, 1934; Nair, 1948). Bei *Neomysis integer* (Mysidacea) konnte Scholtz (1984) schon kurz nach Beginn der Gastrulation die Mehrheit der Ektoteloblasten als großkernige Zellen in einer gekrümmten Reihe identifizieren, wohingegen Manton (1928) bei *Hemimysis lamorae* (Mysidacea) erst nach dem Ende der Gastrulation die Ektoteloblasten als plasmareiche Zellen erkennen konnte. Anders verhält es sich bei dem Mysiden *Mesopodopsis orientalis*, bei dem alle Ektoteloblasten bereits vor Beginn der Gastrulation zellmorphologisch als großkernige, langgestreckte Zellen erkennbar sind (Nair, 1939). Beim Leptostraken *Nebalia bipes* sind allerdings die Ektoteloblasten erst dann zellmorphologisch als solche erkennbar, wenn die Kopflappen schon deutlich ausgeprägt sind, d.h. ein Entwicklungsstadium weit nach dem Ende der Gastrulation erreicht worden ist (Manton, 1934). Bei den Dekapoden *Cherax destructor* (Astacidea) und *Sicyonia ingentis* (Dendobranchiata) können die ersten Ektoteloblasten erst nach dem Schließen des Gastrulationsporus beobachtet werden, wenn die beiden Vorläuferzellen der Mesoteloblasten unter dem Blastoderm erkennbar sind (Scholtz, 1992; Hertzler, 2002). Demgegenüber können bei anderen Vertretern der Decapoda, wie z.B. *Eupagurus prideauxi* (Anomura), *Hemigrapsus sanguineus* (Brachyura), *Heptacarpus rectirostris* (Caridea) und *Pagurus samuelis* (Anomura), einige der Ektoteloblasten schon vor

Beginn der Gastrulation identifiziert werden (Ōishi, 1959, 1960). Ähnlich verhält es sich auch bei den Isopoden. Bei *Bopyroides hippolytes*, *Cyathura polita*, *Hemiarthrus abdominalis*, *Irona far*, *Irona robusta* und *Pseudione crenulata* sind die Ektoteloblasten dann zellmorphologisch identifizierbar, wenn auch die mesentodermalen Zellen sich in Vitellophagen, Mesoteloblasten und Zellen des Entoderms differenziert haben (Nair, 1956; Strömberg, 1971, 1972). Eine derartige zeitliche Korrelation zwischen der Differenzierung der Ektoteloblasten und des Mesenteriums kann für *Porcellio scaber* aufgrund fehlender Daten zur Entwicklung des Mesoderms nicht beurteilt werden.

Mit der Teilungsaktivität der Ektoteloblasten wird ein Großteil des Zellmaterials gebildet, das für die Keimstreifverlängerung notwendig ist (Dohle, 1970; Scholtz, 1992, 2000, 2002; Dohle und Scholtz, 1995; Dohle et al., 2004; Wolff, 2009; Übersichtsartikel Scholtz und Wolff, 2013). Die Embryogenese der Kellersassel *Porcellio scaber* wurde schon von Vehling (1994), Hejnol (2002), Wolff (2009) und Milatović et al. (2010) umfassend und anschaulich dargestellt. Wie diese gezeigt haben, sind die Ektoteloblasten in einer mehr oder weniger gebogenen Reihe angeordnet und bereits früh determiniert (Vehling, 1994), wenn nicht sogar schon als solche zellmorphologisch erkennbar (Hejnol, 2002). Hejnol (2002) beobachtete bei *Porcellio scaber*, dass die Ektoteloblasten schon zu Beginn der Gastrulation und damit vor Aufnahme ihrer Teilungsaktivität als die größten Zellen der Keimscheibe identifizierbar sind. Die hier vorliegenden Daten widersprechen jedoch den Beobachtungen Hejnols (2002) und zeigen, dass alle Zellen der Keimscheibe bis zum Ende der Bildung der ersten e-Reihe gleichgroß sind und die Ektoteloblasten erst danach ihre zellmorphologischen Charakteristika ausgebildet haben. Nur aufgrund der rückwärtsgerichteten Analyse mit dem FIJI PlugIn MaMuT können die Ektoteloblasten schon vor und während der Gastrulation, d.h. vor Aufnahme ihrer typischen Teilungstätigkeit, als solche identifiziert werden. Diese Beobachtung stimmt mit der von Vehling (1994) überein, dass die „optische Differenzierung“ der Ektoteloblasten eine Begleiterscheinung der teloblastischen Tätigkeit ist und die Ektoteloblasten weder größer als umliegende Blastodermzellen sein

müssen noch einen größeren Zellkern aufweisen müssen, um mit ihrer typischen Teilungsaktivität beginnen zu können. Gleiches wurde auch von Strömberg (1972) für den Isopoden *Cyathura polita* gezeigt. Jedoch ist an dieser Stelle anzumerken, dass die zellmorphologische Identifizierung der Ektoteloblasten in der vorliegenden Studie ausschließlich anhand der Zellgröße und der späteren Teilungsaktivität erfolgen konnte. In anderen Arbeiten über Dekapoden, Cumaceen und Isopoden wurden hingegen die Ektoteloblasten in der sich bildenden Keimscheibe anhand von Kernfärbungen untersucht und durch eine Größenzunahme der Zellen und Zellkerne erkannt (z.B. Dohle, 1970; Strömberg, 1971; Scholtz, 1992). Es kann daher hier nur vermutet werden, dass mit Größenzunahme der Ektoteloblasten bei *Porcellio scaber* auch die Zellkerne an Größe zunehmen, was jedoch aufgrund der Färbung des Zelllumens bei *Porcellio scaber* nicht beobachtet werden konnte und in weiteren Studien überprüft werden müsste.

Innerhalb der Malacostraca tritt sehr häufig eine sukzessive zellmorphologische Differenzierung der Ektoteloblasten auf. Sie wird bei den Dekapoden *Caridina laevis* (Nair, 1948), *Hemigrapsus sanguineus* (Ōishi, 1960), *Heptacarpus rectirostris* (Ōishi, 1959), *Mesopodopsis orientalis* (Nair, 1939) und *Pagurus samuelis* (Ōishi, 1959) sowie den beiden Isopoden *Isona far* und *Isona robusta* (beide Nair, 1956) beschrieben. Bei dem Dekapoden *Caridina laevis* sind z.B. schon vor der Bildung der ersten e-Reihe zwölf der finalen 21 Ektoteloblasten anhand ihrer vergrößerten Zellkerne und der teloblastentypischen Verteilung des Chromatins erkennbar (Nair, 1948). Eine zellmorphologische Differenzierung aller Ektoteloblasten vor Beginn ihrer typischen Teilungstätigkeit wurde bisher nur für einen Vertreter der Isopoda beschrieben (z.B. McMurrich, 1895; Hahnenkamp, 1974; Vehling, 1994; Hejnol, 2002). Hejnol (2002) konnte bei *Porcellio scaber* bereits mit Beginn der Gastrulation einen Großteil der Ektoteloblasten als große Zellen erkennen.

Sowohl bei den Isopoden wie auch dem Tanaiden *Heterotanais oerstedii* entspricht die Anordnung der Zellen der e-Reihe exakt der Anordnung der Ektoteloblasten und weist zu keinem Zeitpunkt der

Entwicklung Lücken im Gittermuster auf (Nair, 1956; Scholl, 1963; Dohle, 1972). Dabei stellt sich die Frage wie und wo sich die Zahl der Ektoteloblasten erhöht, da zu Beginn der ersten Teilungswelle noch nicht die finale Anzahl erreicht ist. In den Ektoteloblasten der eben genannten Taxa konnten keine Teilungsspindeln parallel zur Reihe der Ektoteloblasten beobachtet werden, was für eine Entstehung zweier Ektoteloblasten aus derselben Vorläuferzelle sprechen würden, weshalb die Differenzierung weiterer Ektoteloblasten nur am Rand erfolgen kann. Folglich erhöht sich deren Anzahl im weiteren Verlauf der Embryogenese durch Umwandlung ektodermaler Zellen (Nair, 1939; Hahnenkamp, 1974). Diese gliedern sich seitlich an die Reihe der Ektoteloblasten an und nehmen ebenfalls ihre Teilungstätigkeit auf, so wie es für *Diastylis rathkei* (Crustacea, Cumacea) beschrieben wurde (Dohle, 1970).

Anders als bei McMurrich (1895), Hahnenkamp (1974) und Vehling (1994) konnte in den hier vorliegenden Daten auch eine Bildung zweier Ektoteloblasten aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle im Randbereich der Reihe der Ektoteloblasten beobachtet werden (in dieser Arbeit rosa markierte Zellen). Dies sind jedoch nur Einzelfälle und somit nicht repräsentativ für die Bildung von Ektoteloblasten, da in den Embryonen A bis D jeweils nur eine solche Vorläuferzelle beobachtet werden konnte. Obwohl Ōishi (1959, 1960) für drei Vertreter der Decapoda zeigen konnte, dass Ektoteloblasten aus gemeinsamen Vorläuferzellen entstehen können, ist bei *Porcellio scaber* dennoch eher eine ähnliche Bildung weiterer Ektoteloblasten über die Differenzierung ektodermaler Zellen wie bei anderen Isopoden anzunehmen (Hahnenkamp, 1974). Hierbei ist zu erwähnen, dass der Zellverband im Randbereich der Reihe der Ektoteloblasten zumeist etwas lockerer ist, sodass es theoretisch möglich wäre, dort die Anzahl der Ektoteloblasten auch durch eine parallel zur Reihe der Ektoteloblasten gerichtete Teilung zu erhöhen und nicht nur durch die Determinierung und Differenzierung umliegender ektodermaler Zellen. Da jedoch mit Beginn der Keimstreifverlängerung die Zellen der Keimscheibe sehr kompakt und eng liegen (Nair, 1956), ist anzunehmen, dass dies nur am Anfang der Bildung des äußeren Halbkreises möglich ist. Im weiteren Verlauf der Embryogenese findet die Bildung weiterer

Ektoteloblasten wahrscheinlich nur noch an den Rändern der Reihe und aus den umliegenden Ektodermzellen statt (McMurrich, 1895; Nair, 1939, 1956; Shiino, 1942; Übersichtsartikel Anderson, 1973; Hahnenkamp, 1974; Scholtz, 1992; Vehling, 1994).

Ob die neu hinzukommenden Ektoteloblasten die bereits erfolgten Teilungszyklen nachholen oder auslassen, kann auf Grundlage der hier vorliegenden Daten nicht eingeschätzt werden.

Die Anzahl der Ektoteloblasten in der frühen Keimscheibe (vor Beginn der Gastrulation) ist bei Isopoden inter- und intraspezifisch verschieden (TABELLE 10; Strömberg, 1972; Übersichtsartikel Anderson, 1973; Hahnenkamp, 1974). Zum Ende der Gastrulation sind bei *Limnoria lignorum* erst sechs, dagegen bei *Irona far* und *Irona robusta* schon 19 Ektoteloblasten erkennbar. Hahnenkamp (1974) zählte vor Beginn der Gastrulation bei *Asellus aquaticus* elf bis 16 Ektoteloblasten (von insgesamt 21 bis 25) und bei *Ligia oceanica* 15 bis 25 Ektoteloblasten. Auch die endgültige Anzahl der Ektoteloblasten variiert bei den verschiedenen Vertretern der Isopoda (vgl. TABELLE 10). Für *Limnoria lignorum* beschrieb Hahnenkamp (1974) insgesamt 21 bis 23 Ektoteloblasten und für die beiden *Irona*-Arten 25 Ektoteloblasten. Bei *Porcellio scaber* konnten in der hier vorliegenden Arbeit zu Beginn der Teilungsaktivität mindestens 13 Ektoteloblasten identifiziert werden (bzw. 15 inklusive der Zellen unsicherer Identität, braun markiert), demnach in deren Reihen noch etwa vier bis zehn weitere Ektoteloblasten bis zu der für *Porcellio scaber* in der Literatur angegebenen finalen Anzahl von 17 bis 23 Ektoteloblasten fehlen (Vehling, 1994). Deren Bildung konnte weder von Vehling (1994) noch Hejnol (2002) im Detail beobachtet werden und auch die hier vorliegenden Daten liefern diesbezüglich keine neuen Ergebnisse, sodass nur Vermutungen geäußert werden können.

Innerhalb der Perakariden kann sich die Anzahl der Ektoteloblasten zwischen den beiden Körperseiten eines Embryos unterscheiden (McMurrich, 1895; Dohle, 1970, 1976; Hahnenkamp, 1974; Scholtz, 1984; Vehling, 1994; Hejnol, 2002). Für den Isopoden *Ligia oceanica* zeigte Hahnenkamp (1974) zu Beginn der Bildung der ersten e-Reihe sieben Ektoteloblasten auf der linken und neun auf der rechten Körperseite. Bei

Porcellio scaber konnten während der Gastrulation acht und sieben Ektoteloblasten auf beiden Körperseiten beobachtet werden. Im weiteren Verlauf der Embryogenese gleicht sich zumeist die Zahl der Ektoteloblasten auf beiden Körperseiten aus, sodass zu Beginn der Teilungsaktivität jede Körperseite acht Ektoteloblasten aufweist.

TABELLE 10: Anzahl der Ektoteloblasten bei Isopoden vor der Gastrulation und final. Alle Angaben (außer die eigenen) basieren auf Tabelle 6 aus Hahnenkamp (1974). „-“ = keine Angabe.

Art	Anzahl der differenzierten Ektoteloblasten		Quelle
	Vor der Gastrulation	Finale Anzahl	
<i>Armadillidium vulgare</i>	„mehr als 11“	ca. 23	McMurrich, 1985
<i>Asellus aquaticus</i>	14	21-25	Hahnenkamp, 1974; Weygoldt, 1960b
<i>Asellus communis</i>	11	22	McMurrich, 1985
<i>Hemiarthrus abdominalis</i>	-	19	Strömberg, 1971
<i>Idotea granulosa</i> , <i>Idotea neglecta</i>	„wenige“	21-25	Strömberg, 1965
<i>Irona far</i> , <i>Irona robusta</i>	19	25	Nair, 1956
<i>Jaera marina</i>	-	23-25	McMurrich, 1985
<i>Ligia oceanica</i>	15-25	20-28	Hahnenkamp, 1974; McMurrich, 1985; Nusbaum, 1893
<i>Limnoria lignorum</i>	3+3	21-23	Strömberg, 1967
<i>Porcellio scaber</i>	11-15 7-16	17-23 16-22	Vehling, 1994 eigene Beobachtungen
<i>Pseudione crenulata</i>	9	15	Strömberg, 1971

4.5 Teilungsaktivität der Ektoteloblasten

Vehling (1994) beschrieb im Kontext der Bildung der Ektoteloblasten, d.h. vor Beginn ihrer Teilungstätigkeit, zwei in der Keimscheibe identifizierbare Ringe, die das Gastrulationszentrum umgeben: einen Inneren und einen Äußeren. Im Äußeren finden vereinzelte Mitosen im Bereich der zukünftigen Ektoteloblasten statt, die jedoch kein Muster erkennen lassen und deren Teilungsrichtung quer verläuft. Zu einer typischen teloblastischen Teilung bedarf es laut Vehling (1994) jedoch einer starken Inäqualität und einer regelmäßigen Teilungsabfolge von innen nach außen. Die erste echte teloblastische Teilung kann demnach

erst beobachtet werden, nachdem die Zellen des äußeren Halbkreises sich in einen Ektoteloblasten und eine Zelle der Reihe AB geteilt haben. Zu diesem Zeitpunkt weisen die Ektoteloblasten noch nicht ihr charakteristisches Aussehen auf (Vehling, 1994).

Bei der Teilungswelle ist eine gewisse Synchronizität zwischen beiden Körperseiten zuerkennen (Vehling, 1994), die jedoch nicht in jedem Embryo zu finden ist. Die zellmorphologische Differenzierung der Ektoteloblasten beginnt während der Bildung der ersten e-Reihe (eI) und ist erst mit Beginn der Bildung der zweiten e-Reihe (eII) abgeschlossen. Nun sind die Ektoteloblasten als große, rechteckige Zellen identifizierbar, die in einer annähernden Geraden angeordnet sind. Die dritte Teilungswelle beginnt erst, wenn die vorhergehende abgeschlossen wurde (Vehling, 1994). Die Teilungsreihenfolge der Ektoteloblasten ET₁ bis ET₈ erfolgt dabei in einem erkennbaren Muster von innen nach außen, wobei einzelne Ektoteloblasten übersprungen werden können (Hejnal, 2002). Außerdem beschrieb Hejnal (2002), dass die Teilungsrichtung auf der einen Körperseite von innen nach außen und auf der anderen Körperseite entgegengesetzt gerichtet ist. Bei den weiteren Teilungswellen werden die beobachteten Unregelmäßigkeiten in der Teilungsabfolge weniger und es entsteht zunehmend eine lückenlose Teilungswelle von innen nach außen. Die hier vorliegenden Daten unterstützen die Beobachtungen von Vehling (1994) und Hejnal (2002), widersprechen jedoch der von Hejnal (2002) erwähnten unterschiedlichen Teilungsrichtung auf beiden Körperseiten bei der Bildung der ersten e-Reihe. Bei der Betrachtung von nur einer Körperseite ist zusätzlich feststellbar, dass erst mit der Bildung der zweiten e-Reihe begonnen wird, wenn die Bildung der ersten Reihe auf der gleichen Körperseite abgeschlossen ist (Embryonen A-C und 6-8; TABELLE A11). Zwischen beiden Körperseiten ist dieser Zusammenhang jedoch nicht feststellbar und es können Überschneidungen auftreten (z.B. Embryo A; TABELLE A11).

Grundlegend sind bei *Porcellio scaber* mit Beginn der Teilungstätigkeit alle bereits determinierten Ektoteloblasten an der Bildung der ersten e-Reihe beteiligt, so wie es Hahnenkamp (1974) auch bei

anderen Vertretern der Isopoda beschrieb und schon Vehling (1994) für die Kellerassel annahm (ABBILDUNG 19 B, D).

Bei den Vertretern der Mancoida, also der Cumacea, Tanaidacea und Isopoda (ABBILDUNG 18), verläuft die Teilungswelle auf beiden Körperseiten von medial nach lateral, wobei sie bei den Cumacea und Tanaidacea fast immer beim ET_2 beginnt (Dohle, 1970, 1972). Auch bei den Vertretern der Isopoda beginnen die Teilungswellen nie beim mittleren Ektoteloblasten (ET_0) (ABBILDUNG 19 B), jedoch können Abweichungen in der Teilungsabfolge der Ektoteloblasten auftreten (Hahnenkamp, 1974), so wie es auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Dabei konnte bei *Porcellio scaber* festgestellt werden, dass die Teilungswellen auf der linken Körperseite wie bei den Cumacea und Tanaidacea zumeist beim ET_2 beginnen und lediglich auf der rechten Körperseite (ET_1 oder ET_3) etwas davon abweichen.

Der Zeitpunkt, zu dem sich der mittlere Ektoteloblast (ET_0) teilt, scheint bei den Isopoden nicht festgelegt zu sein. So teilt sich ET_0 bei *Hemiarthrus abdominalis* und *Pseudione crenulata* erst, wenn die aktuelle Teilungswelle abgeschlossen ist (Strömberg, 1971). Bei der Kellerassel *Porcellio scaber* variiert dagegen der Zeitpunkt der Teilung des mittleren Ektoteloblasten zwischen den untersuchten Embryonen.

Bei den Vertretern der Mysidacea, der Schwestergruppe der Amphipoda und Mancoida (ABBILDUNG 18), findet ebenfalls eine von innen nach außen gerichtete Teilungswelle statt (Manton, 1928; Scholtz, 1984). Demnach kann als Grundmuster der Peracarida eine von der Mitte des Keimstreifens nach außen gerichtete Teilungswelle angenommen werden, die jedoch nicht an der Mittellinie (bei ET_0) beginnt (wie in ABBILDUNG 19 B dargestellt).

4.6 Der mittlere Ektoteloblast

Ein mittlerer Ektoteloblast (ET_0) findet sich in allen malakostraken Gruppen (Leptotraca: *Squilla squilla*, Manton, 1934; Nair, 1941; Stomatopoda: *Gonodactylus falcatus*, Fischer et al., 2010; *Squilla oratoria*,

Shiino, 1942; Decapoda: *Caridina laevis*, Nair, 1948; *Cherax destructor*, Scholtz, 1992; *Eupagurus prideauxi*, Scheidegger, 1976; *Hemigrapsus sanguineus*, Ōishi, 1960; *Heptacarpus rectirostris*, Ōishi, 1959; *Pagurus samuelis*, Ōishi, 1960; *Sicyonia ingentis*, Hertzler, 2002; Syncarida: *Anaspides tasmaniae*, Hickman, 1937; Mysidacea: *Hemimysis lamorae*, Manton, 1928; Isopoda: Hahnenkamp, 1974). Eine verzögerte Differenzierung des mittleren Ektoteloblasten, wie es bei manchen Malakostraken beobachtet wurde (Manton, 1934; Strömberg, 1972; Scholtz, 1992), konnte bei dem Isopoden *Porcellio scaber* jedoch nicht beobachtet werden, da alle determinierten Ektoteloblasten sich nach der Bildung der ersten e-Reihe zellmorphologisch identifizieren lassen und der mittlere Ektoteloblast sich dabei nicht von den übrigen unterscheidet. Wenn die Zellen, die Teile der späteren Mittellinie bilden, die Reihe der Ektoteloblasten verlassen, wird die dabei entstehende Lücke bei der Kellerassel *Porcellio scaber* durch Zellwanderung der medialen (ET₁ und ET₂) und des mittleren Ektoteloblasten geschlossen, wodurch der Halbkreis zusätzlich zu einer annähernden Gerade wird.

McMurrich (1895) beschrieb im Verlauf der Begradigung der Reihe der Ektoteloblasten bei den Isopoden *Armadillidium vulgare*, *Jaera marina* und *Porcellio scaber* einen Größenunterschied zwischen den medianen und den seitlichen Ektoteloblasten. Die vorliegenden Daten widersprechen dieser Beschreibung und zeigen, dass alle Ektoteloblasten im Verlauf der Begradigung ihrer Reihe bei *Porcellio scaber* bis zum Beginn ihrer Teilungstätigkeit die gleiche Größe haben. Mit Vollendung der ersten e-Reihe sind alle Ektoteloblasten größer als die übrigen Zellen des Ektoderms, untereinander gleich groß und behalten fortan ihre Größe bei. Außerdem wird der mittlere Ektoteloblast ET₀ bei einigen Vertretern der Isopoda in seiner Größe und Form („etwas verlängert“) als zu den übrigen Ektoteloblasten verschieden beschrieben (Hahnenkamp, 1974). Unterdessen kann er in einigen Arten sowohl kleiner (*Asellus aquaticus*, Weygoldt, 1960; *Idotea granulosa* und *Idotea neglecta*, Strömberg, 1965; sowie *Ligia oceanica*, Hahnenkamp, 1974) als auch größer (*Asellus communis* und *Jaera marina*, McMurrich, 1895) erscheinen. Bei der Kellerassel kann der mittlere Ektoteloblast hingegen nur anhand seiner

leicht nach posterior versetzten Lage in der Reihe der Ektoteloblasten und anhand der sich vor ihm bildenden Mittellinie erkannt werden (Vehling, 1994; Hejnal, 2002).

4.7 Begradigung des äußeren Halbkreises und die Zellen, die einen Teil der Mittellinie bilden

Das Teilungsverhalten und die Bedeutung der ventralen Mittellinie wurden vor allem bei jenen Taxa untersucht, in deren Entwicklung ein Stadium mit einem Keimstreifen auftritt, wie es z.B. bei den Insekten und den Malacostraca der Fall ist. Neben Arbeiten über die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Diptera, Hexapoda) stehen auch detaillierte Beschreibungen über verschiedene Vertreter der Malacostraca, wie z.B. den beiden Amphipoden *Cryptorchestia cavimana* syn. *Orchestia cavimana* (Gerberding und Scholtz, 1999, 2001) und *Parhyale hawaiiensis* (Vargas-Vila et al., 2010), zur Verfügung. Bei *Porcellio scaber*, bei dem die Keimstreifverlängerung durch die Teilungsaktivität von Ektoteloblasten realisiert wird, wurde dagegen die Bildung und das Expressionsmuster der Mittellinie bisher nur wenig untersucht (Gerberding, 1999; Hejnal, 2002). Hejnal (2002) beschrieb lediglich die Teilungsabfolgen der medianen Zellen (A_0 und B_0), ihrer rechten und linken Nachbarzellen (A_1 und B_1) und von drei Zellen, die anterior der Ektoteloblasten im Bereich der Mittellinie lokalisiert sind. Mit der Teilung der drei Zellen im Bereich der Mittellinie beginnt bei *Porcellio scaber* die Teilungsaktivität der Ektoteloblasten (Hejnal, 2002). Auch in der hier vorliegenden Arbeit konnten Zellen im Bereich der späteren Mittellinie identifiziert werden, die bis zum Beginn der ektoteloblastischen Teilungen im Halbkreis der Ektoteloblasten eingereiht sind (z.B. Aufnahmen 3, 5, 7 und 8). Obwohl keine feste Anzahl dieser Zellen beobachtet werden konnte, stimmen die vorliegenden Ergebnisse bezüglich des Zeitpunktes ihrer Teilung mit der Beschreibung von Hejnal (2002) überein (gelb markierte Zellen in Aufnahme 3, 43 bis 46 s).

Dohle (1990) beschrieb bei *Diastylis rathkei* (Cumacea) ebenfalls zwei Zellen, die zwischen den beiden Halbreihen der Ektoteloblasten lokalisiert sind, sich aber in der Größe ihrer Zellkerne von den

Ektoteloblasten unterscheiden. Während die beiden Halbreihen der Ektoteloblasten nach anterior und aufeinander zuwandern, bis sie sich vor dem Gastrulationsporus treffen, wird eine der beiden Zellen zum mittleren Ektoteloblasten (Dohle, 1990), was Ōishi (1959, 1960) und Scholtz (1992) auch bei den Dekapoden *Cherax destructor* (Astacidea), *Hemigrapsus sanguineus* (Brachyura), *Heptacarpus rectirostris* (Caridea) und *Pagurus samuelis* (Anomura) beobachteten. Das Schicksal der zweiten Zelle blieb hingegen ungeklärt. Es könnte sich dabei jedoch auch um eine Zelle handeln, die einen Teil der späteren Mittellinie bildet, so wie es in der vorliegenden Arbeit für *Porcellio scaber* gezeigt werden konnte.

4.8 Ist die Reihe AB ektoteloblastischen Ursprungs?

Bereits Hahnenkamp (1974) diskutierte, ob Ektoteloblasten wirklich erst kurz vor Beginn ihrer typischen Teilungsaktivität determiniert sind oder nicht schon deutlich früher. Dabei beschäftigte ihn vor allem die Zusammensetzung der Zellreihen anterior der von den Ektoteloblasten gebildeten e-Reihen. Innerhalb der Malacostraca sind neben den Ektoteloblasten und deren Abkömmlinge (e-Reihen) auch die Zellen der Reihen A und B (E-Reihen), die anterior zu diesen lokalisiert sind, an der Bildung des Gittermusters beteiligt (Dohle und Scholtz, 1988; Scholtz, 1990, 2000; Wolff und Scholtz, 2002). Die Zellen der Reihen A und B werden innerhalb der Peracarida auf unterschiedliche Weise gebildet und sind anfangs noch ungeordnet, ordnen sich jedoch mit Beginn der Teilungsaktivität der Ektoteloblasten zunehmend in Zellreihen und -säulen an (Hahnenkamp, 1974; Dohle und Scholtz, 1988; Scholtz, 2000). Bei *Porcellio scaber* entsprechen die von Hahnenkamp (1974) diskutierten Zellreihen, die anterior der e-Reihen ektoteloblastischen Ursprungs liegen, der Reihe AB oder der Reihe B (Vehling, 1994; Hejnal, 2002; diese Arbeit). Diese Zellreihen entstehen bei *Ligia oceanica* teilweise aus einer als unregelmäßig beschriebenen Teilung der Ektoteloblasten, bevor diese ihre typische Teilungsaktivität beginnen (Hahnenkamp, 1974). Die

restlichen Zellen werden aus dem Blastoderm rekrutiert, die ohne erkennbares Muster anterior der e-Reihen im Blastoderm verteilt sind (Hahnenkamp, 1974). Dabei stellt sich nun die Frage, ob die Ektoteloblasten bereits bei der Bildung dieser Zellreihe determiniert sind oder noch nicht. Auch Dohle (1970) beschäftigte sich mit den mitotischen Teilungen während der Determinierung der Ektoteloblasten. Aufgrund der noch fehlenden teloblastentypischen Merkmale und dem fehlenden Größenunterschied zwischen den beiden Tochterzellen (d.h. fehlende Inäqualität; Vehling, 1994; Dohle und Scholtz, 1997) stufte er diese als „unregelmäßige Teilungen“ von noch nicht determinierten Ektoteloblasten ein (Dohle, 1970). Bei *Porcellio scaber* entstehen vor Beginn der Gastrulation Zellen der Reihe AB und Ektoteloblasten durch mitotische Teilungen aus gemeinsamen Vorläuferzellen. Diese Vorläuferzellen weisen jedoch noch keine charakteristischen Merkmale eines Ektoteloblasten auf, wie etwa ein großes Zelllumen und einen großen, kugeligen Zellkern, der hell gefärbt ist und zwei Nukleolen besitzt (Dohle, 1970; Hahnenkamp, 1974). Zusätzlich werden dann die Reihen A und B anterior der e-Reihen mit Zellen aus dem Blastoderm aufgefüllt (Sternchen markierte Zellen in TABELLE 8). Nun gibt es zwei Möglichkeiten: entweder sind die Ektoteloblasten zu diesem Zeitpunkt bereits determiniert und die Zellen der Reihe AB (zumindest teilweise) ektoteloblastischen Ursprungs, obwohl keine inäqualen Teilungen beobachtet werden können, oder die Ektoteloblasten sind noch nicht determiniert und die angesprochenen Zellen der Reihe AB entstehen durch mitotische Teilung einer gemeinsamen Vorläuferzelle (Dohle, 1970). Falls die Reihe AB tatsächlich ektoteloblastischen Ursprungs ist, müsste sie folglich als erste e-Reihe bezeichnet werden. Dafür würden ein mit den e-Reihen vergleichbares Teilungsverhalten, eine vergleichbare Zellgröße ihrer Abkömmlinge (Reihe A und B) und eine vergleichbare Anordnung in Zellreihen und -säulen (ABBILDUNG 19 A, D) sprechen (in dieser Arbeit nicht dokumentiert; Hahnenkamp, 1974; Vehling, 1994; Hejnol, 2002). Das würde in der Konsequenz bedeuten, dass bei *Porcellio scaber* alle (nauplialen und postnauplialen) Segmente aus dem äußeren Halbkreis entstehen und nur im nauplialen Bereich der Reihen A und B durch die Rekrutierung

vereinzelter Blastodermzellen aufgefüllt werden würde. Es scheint jedoch aufgrund der fehlenden Inäqualität bei der Teilung der Vorläuferzellen in einen Ektoteloblasten und eine Zelle der Reihe AB wahrscheinlicher, dass die Ektoteloblasten noch nicht determiniert sind und diese Teilung nicht als erste Teilung der Ektoteloblasten einzustufen ist.

4.9 Gemeinsamkeiten der Isopoden

Der Gastrulationsporus wird bei Cumaceen und einigen Isopoden, wie z.B. *Asellus aquaticus* und *Ligia oceanica*, anterior durch einen Zellhalbkreis der Ektoteloblasten begrenzt (Cumaceen: Dohle, 1970; Isopoden: Hahnenkamp, 1974), wohingegen es bei *Porcellio scaber* einen inneren und einen äußeren Halbkreis gibt (Vehling, 1994). Hahnenkamp (1974) standen für seine Zelllinienanalysen lediglich Präparate von zwei aufeinanderfolgenden Entwicklungsstadien zur Verfügung, die jedoch zur Bestimmung der Anzahl der Zellen des inneren Halbkreises nicht geeignet waren. Die Zellzahl kann deshalb für *Ligia oceanica* nur anhand der bereitgestellten Abbildungen abgeschätzt werden und scheint zwischen 14 und 17 Zellen zu betragen. Bei *Porcellio scaber* besteht der innere Halbkreis vor Beginn der Gastrulation aus zwölf bis 15 Zellen, deren Anzahl sich im weiteren Verlauf der Embryogenese auf 14 bis 18 Zellen erhöht. Folglich ähnelt sich die Zellzahl des inneren Halbkreises bei beiden Isopoden.

Darüber hinaus lassen sich weitere Gemeinsamkeiten zwischen der Kellerrassel *Porcellio scaber* und anderen Isopoden feststellen, die mit dem von Hahnenkamp (1974) abgeleiteten Muster der Formierung und Teilung der Ektoteloblasten bei Isopoden übereinstimmen. Die Reihe der Ektoteloblasten wird durch sich sukzessiv anordnende Zellen im Randbereichen verlängert. Die Teilungswelle der Ektoteloblasten beginnt stets bei den medialen Ektoteloblasten (ET_1 - ET_2) und niemals beim medianen Ektoteloblasten (ET_0), den jedoch alle Arten aufweisen (ABBILDUNG 19 B, D; Hahnenkamp, 1974; Vehling, 1994). In der Reihe der Ektoteloblasten erscheinen zuerst die medialen Ektoteloblasten

anterior des Gastrulationszentrums und beginnen mit ihrer Teilungstätigkeit, wenn die Gastrulation abgeschlossen ist. Bei allen Isopoden sind die Ektoteloblasten erst spät als langgestreckte und großkernige Zellen erkennbar (McMurrich, 1892; Strömberg, 1971; Hahnenkamp, 1974). Ebenfalls entstehen bei fast allen Isopoden weitere Ektoteloblasten durch die Determinierung und Differenzierung umliegender Blastodermzellen und nicht durch mitotische Teilung einer Vorläuferzelle. Nur bei *Porcellio scaber* konnte in der hier vorliegenden Arbeit vereinzelt eine mitotische Teilung einer Vorläuferzelle in zwei Ektoteloblasten beobachtet werden.

Bei *Jaera albifrons* beobachtete McMurrich (1892) vier zentrale vergrößerte Zellen, die er als Zellen des Entoderms identifizierte und die von einem Ring aus zwölf Zellen des Mesoderms umgeben sind (ABBILDUNG 20 A). Auch bei der Kellersassel *Porcellio scaber* identifizierte McMurrich (1895) anhand veränderter Färbereigenschaften vier zentrale Zellen der frühen Keimscheibe zum Zeitpunkt der Membranbildung, die im weiteren Verlauf der Embryogenese die Zellen des Ento- und Mesoderms sowie die Urkeimzellen bilden sollen (ABBILDUNG 20 B). Jedoch konnte er nicht wie bei *Jaera albifrons* zwischen den Zellen des Ento- und Mesoderms unterscheiden, weshalb er die vier auffälligen Zellen als Mesentoderm bezeichnete. Eine Differenzierung von Ento- und Mesoderm vor Beginn der Gastrulation kann auch nicht auf Grundlage der hier vorliegenden Daten vorgenommen werden. Daher sollte die Entstehung und Teilung der vier zentralen Zellen (Mesentoderm), vor allem während der Keimscheibenbildung und Gastrulation, noch einmal mit Hilfe von membranbindender Vitalfarbstoffe genauer untersucht und validiert werden.

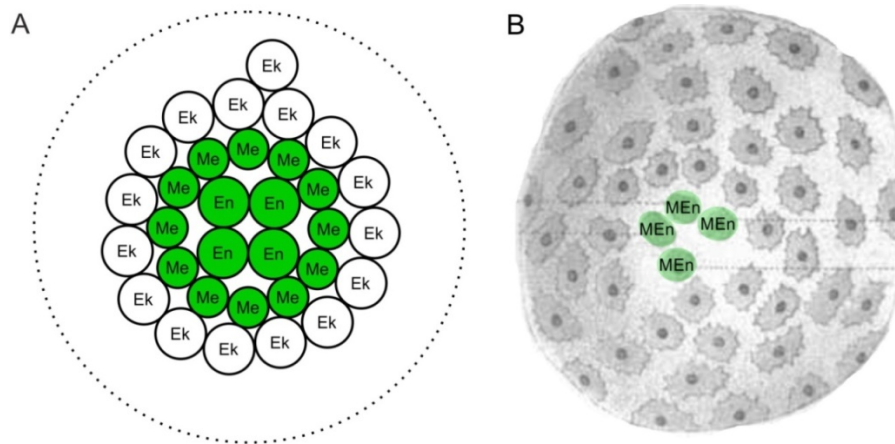


ABBILDUNG 20: Frühe Keimscheiben der Isopoden *Jaera albifrons* und *Porcellio scaber*. **A:** zeigt die frühe Keimscheibe bei *Jaera albifrons* im Schema aus einer Ventralansicht (nach Abbildung 2 in McMurrich, 1892); **B:** zeigt die frühe Keimscheibe von *Porcellio scaber* (Abbildung 48 modifiziert aus McMurrich, 1895). Grün markiert sind das Ento- und Meso- bzw. Mesentoderm. Ek = Ektoderm; En = Entoderm; Me = Mesoderm; MEn = Mesentoderm.

4.10 Unabhängige Entwicklung der Körperseiten

Bei *Diastylis rathkei* (Cumacea) und *Gammarus pulex* (Amphipoda) wurde eine unabhängige Entwicklung beider Körperseiten mit der Existenz von zwei autonomen und anfangs räumlich getrennten Determinierungszentren erklärt, die sich im weiteren Verlauf der Entwicklung anterior des Gastrulationszentrums verbinden (Dohle, 1970; Scholtz, 1990; Dohle et al., 2004). Dies beruht auf der Annahme, dass sich beide Körperseiten synchron entwickeln würden, wenn es nur ein Determinierungszentrum gäbe. In diese Zentren, die eine definierte Zone um das Gastrulationszentrum darstellen und während der gesamten Embryogenese unabhängig sind, werden Ektoteloblasten festgelegt und bedingen deren Differenzierung (Dohle, 1970). Da sich auch bei *Porcellio scaber* beide Körperseiten asynchron teilen, könnten auch bei der Kellersassel zwei Determinierungszentren angenommen werden, die sich wie bei *Diastylis rathkei* anterior des Gastrulationszentrums befinden. Bereits Hejnol (2002) zeigte bei *Porcellio scaber* mit Hilfe von Ablationsversuchen (Entfernung von Ektoteloblasten), dass sich die beiden Körperseiten der Kellersassel unabhängig entwickeln. Diese von

ihm erkannte Unabhängigkeit beider Körperseiten setzt sich bei der Teilung der Reihe AB und den mitotischen Teilungen (Bildung der Reihen a, b, c und d; hier nur ansatzweise dokumentiert) fort und ist bspw. auch bei der Gen-Expression von *engrailed* zu beobachten (Hejnal und Scholtz, 2004). Die in dieser Arbeit gezeigte asynchrone Bildung der Ektoteloblasten, deren unterschiedliche Anzahl, die ungeordnete Teilungsabfolge und die unabhängige Teilungsabfolge auf der rechten und linken Körperseiten liefern ebenfalls einen Hinweis auf die Existenz von zwei Determinierungszentren anstatt von einem (Embryonen A, C, 6 und 8 im Vergleich zu den Embryonen 4 und 7; ABBILDUNG 10 A; ABBILDUNG 14 C-D; TABELLE A11).

4.11 Differenzierung bedingt Elongation

Bei der Gastrulation werden die Keimblätter „separiert“ (Weygoldt, 1960; Übersichtsartikel Scholtz und Wolff, 2013). Während bei *Jaera marina* alle drei Keimblätter im Verlauf der Gastrulation gebildet werden, konnte bei *Porcellio scaber* noch nicht geklärt werden, ob Ento- und Mesoderm bereits während oder erst nach der Gastrulation ausgeprägt werden (McMurrich, 1895). McMurrich (1895) sprach deshalb bei *Porcellio scaber* vom Mesentoderm und Ektoderm. Wie schon in KAPITEL 4.4.1 erwähnt, beschrieb Dohle (1970) für die Bildung der Ektoteloblasten zwei Phasen: die Determinierung und Differenzierung. Demnach muss ein Ektoteloblast zur Aufnahme seiner Teilungsaktivität bereits determiniert sein, ohne jedoch als solcher zellmorphologisch erkennbar sein zu müssen (Hahnenkamp, 1974). Dohle (1970) schlussfolgerte dabei, dass ein Ektoteloblast durch seine spezifische Lage innerhalb der Keimscheibe (Determinierungszentrum) bestimmt würde. Folglich würde jede Zelle, die sich im Determinierungszentrum befindet, auch zu einem Ektoteloblasten werden und im Verlauf der Entwicklung die typischen zellmorphologischen Merkmale eines Ektoteloblasten ausbilden. Zusätzliche Unterscheidungskriterien differenzierter Ektoteloblasten zur Größe und Form konnten in den vorliegenden Daten für *Porcellio scaber* nicht erkannt

werden. Deshalb bleibt die Lagebeziehung einer Zelle vor Beginn der Bildung der e-Reihen der einzige Hinweis auf die Identifizierung eines Ektoteloblasten bei *Porcellio scaber*. Weitere Analysen mittels Zellmarkierungen, Ablationsversuchen und Untersuchungen mit genetischen Markern könnten dabei helfen, zusätzliche Charakteristika der Ektoteloblasten aufzudecken und die Determinierungszone der Kellerassel genauer zu beschreiben.

Um eine endgültige Aussage über die Abhängigkeit zwischen der Differenzierung und der Verlängerung des Keimstreifens treffen zu können, bedarf es vor allem bei *Porcellio scaber* weiterer Versuche. Im Rahmen von Ablations- und Genexpressionsversuchen könnte bspw. untersucht werden, wie die Gastrulation und die anschließende Verlängerung des Keimstreifens verliefen, wenn die Vorläuferzellen der Ektoteloblasten vor Beginn der Gastrulation ausgeschaltet werden würden. Erste Analysen zur Genexpression in der frühen Keimscheibe von *Porcellio scaber* zeigten, dass bestimmte Gene zur Festlegung der anterior-posterior-Achse, wie z.B. *caudal* und *orthodenticle*, diverse Pair-Rule-Gene und Segment-Polaritätsgene, schon während der Gastrulation exprimiert werden (Lev, 2018; Masterarbeit). Eine detaillierte Zeitauflösung der Genaktivitäten sowie deren exakte Funktionen bei *Porcellio scaber* könnten mittels sogenannter „knock-down-Versuche“ genauer untersucht werden und weiteren Aufschluss über die genetische Determinierung innerhalb der Keimscheibe der Kellerassel liefern.

4.12 Einige Worte zum Begriff der Wachstumszone

Der Begriff der Wachstumszone oder auch Proliferationszone steht schon lange im Fokus der Entwicklungsbiologen und wird anhaltend kritisch diskutiert. Innerhalb der Arthropodengruppen existieren verschiedene Wachstumszonen, deren Entstehung und Funktion unterschiedlich charakterisiert und diskutiert wurden (z.B. Shinmyo et al., 2006; Mayer et al., 2010; Auman et al., 2017). Als Wachstumszone ist eine posterior gelegene Region im Embryo definiert, die eine besonders

hohe Zellteilungsrate aufweist (Übersichtsartikel Scholtz und Wolff, 2013). In verschiedenen Studien wurde jedoch mit Hilfe von Mitosemarkern gezeigt, dass keine erhöhte Zellteilungsrate posterior im Embryo vorkommt (Mayer et al., 2010; Übersichtsartikel Scholtz und Wolff, 2013). Neuere Studien über die Bildung und Entwicklung der Wachstumszone definieren und diskutieren diese daher nun als Segment-Additionszone (kurz SAZ; Janssen et al., 2010; Auman et al., 2017, 2018), in der das Zellmaterial gebildet wird, das anschließend für das sichtbare Längenwachstum des Keimstreifens verantwortlich ist und das im Verlauf der Embryogenese segmentiert wird. In der posterior gelegenen Proliferationszone wird jedoch lediglich das Zellmaterial gebildet, das im späteren Verlauf der Embryogenese die Segmente bildet (Dohle, 1970; Scholtz, 1992; Übersichtsartikel Scholtz und Wolff, 2013). Das eigentliche Längenwachstum im Keimstreifen erfolgt laut Scholtz und Wolff (2013) durch Zellwanderung, Zellneuordnung und Formveränderung der Zellen und kann an unterschiedlichen Stellen im Embryo beobachtet werden. Die Verlängerung des Keimstreifens ist demnach „eine Kombination aus einer posterioren Proliferation und eingefügten (intercalary) Teilungen“, die „kompetentes Zellmaterial generieren, das schließlich segmentiert wird“ (Übersichtsartikel Scholtz und Wolff, 2013). Auman et al. (2018) untergliedern bei *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera, Hexapoda) die Wachstumszone sogar in zwei funktionale Bereiche: eine anteriore und eine posteriore Zone. Diese unterscheiden sich im Genexpressionsmuster und der Proliferationsrate. In der anterioren Zone treten dynamische Genexpressionsmuster und nur wenig Zellproliferation auf, wohingegen in der posterioren Zone ein hohes Level von Zellproliferation und stabile Genexpressionsmuster beobachtet wurden. Interessanterweise lassen sich auch für *Porcellio scaber* erste Parallelen zur Definition der Wachstumszone nach Auman et al. (2018) finden, obwohl angemerkt werden muss, dass Untersuchungen zur Genexpression noch weitestgehend fehlen. Nichtsdestotrotz könnte die Reihe der Ektoteloblasten der von Auman (2018) beschriebenen posterioren Zone entsprechen, da dort ein hohes Level an Zellproliferation in Form der Teilungsaktivität der Ektoteloblasten beobachtet werden kann, wobei die

Menge der Zellteilungen bei weitem nicht so hoch ist, wie die mitotischen und differenziellen Zellteilungen in den e-Reihen. Die e-Reihen hingegen könnten der anterioren Zone *sensu* Auman et al. (2018) entsprechen, die durch dynamische Genexpressionsmuster gekennzeichnet ist. Erste Expressionsdaten für *Porcellio scaber* zeigen ein dynamisches Expressionsmuster für das Hox Gen *Abdominal B* und das Segmentierungsgen *engrailed* (Hejnol, 2002; Brena et al., 2005).

Vor allem Vertreter der Hexapoda, wie z.B. *Drosophila melanogaster* (Diptera), *Oncopeltus fasciatus* (Hemiptera), *Tribolium castaneum* (Coleoptera) oder *Gryllus bimaculatus* (Orthoptera), sind hinsichtlich einer genetischen Charakterisierung der Wachstumszone sehr gut untersucht (Shinmyo et al., 2006). Gene wie *brachyenteron* bei *Gryllus bimaculatus* oder *caudal* und *even-skipped* bei *Oncopeltus fasciatus* haben dabei besondere Funktionen, sie halten die Wachstumszone aktiv und verhindern, dass sich die Zellen der Wachstumszone ausdifferenzieren (Shinmyo et al., 2006; Auman et al., 2017). Derartige Studien fehlen jedoch weitestgehend für die Vertreter der Crustacea und anderer Gruppen innerhalb der Arthropoden.

5. LITERATURVERZEICHNIS

- Abzhanov, A., Kaufman, T. C.** (2000) Crustacean (malacostracan) Hox genes and the evolution of the arthropod trunk. *Development*, 127(11), S. 2239-2249.
- Anderson, D. T.** (1973) Embryology and phylogeny of annelids and arthropods. Pergamon Press, Oxford, S. 263-364.
- Auman, T., Chipman, A. D.** (2018) Growth zone segmentation in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus* sheds light on the evolution of insect segmentation. *Biomedcentral, Evolutionary Biology*, 18(178). doi:10.1186/s12862-018-1293-z
- Auman, T., Vreede, B. M. I., Weiss, A., Hester, S. D., Williams, T. A., Nagy, L. M., Chipman, A. D.** (2017) Dynamics of growth zone patterning in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. *The Company of Biologists Ltd: Development*, 144, S. 1896-1905. doi:10.1242/dev.142091
- Averof, M., Patel, N. H.** (1997) Crustacean appendage evolution associated with changes in Hox gene expression. *Nature*, 388(6643), S. 682-686. doi:10.1038/41786
- Bergh, R. S.** (1892) Die Drehung des Keimstreifens und die Anlage des Dorsalorgans bei *Gammarus pulex*. *Zoologischer Anzeiger*, 15, S. 268-271.
- Brena, C., Liu, P. Z., Minelli, A., Kaufman, T. C.** (2005) *Abd-B* expression in *Porcellio scaber* Latreille, 1804 (Isopoda: Crustacea): Conserved pattern versus novel roles in development and evolution. *Evolution and Development*, 7(1), S. 42-50. doi:10.1016/j.ydbio.2009.01.040
- Chipman, A. D.** (2015) An embryological perspective on the early arthropod fossil record. *Biomedcentral, Evolutionary Biology*, 15(1), 285. doi:10.1186/s12862-015-0566-z

- Chipman, A. D., Akam, M.** (2008) The segmentation cascade in the centipede *Strigamia maritima*: Involvement of the Notch pathway and pair-rule gene homologues. *Developmental Biology*, 319(1), S. 160-169. doi:10.1016/j.ydbio.2008.02.038
- Clark-Hachtel, C. M., Tomoyasu, Y.** (2017) Two sets of wing homologs in the crustacean, *Parhyale hawaiiensis*. bioRxiv. doi:10.1101/236281
- Copf, T., Rabet, N., Celniker, S. E., Averof, M.** (2003) Posterior patterning genes and the identification of a unique body region in the brine shrimp *Artemia franciscana*. *Development*, 130(24), S. 5915-5927. doi:10.1242/dev.00835
- Copf, T., Schröder, R., Averof, M.** (2004) Ancestral role of *caudal* genes in axis elongation and segmentation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(51), S. 17711-17715. doi:10.1073/pnas.0407327102
- Damen, W. G. M., Weller, M., Tautz, D.** (2000) Expression patterns of *hairy*, *even-skipped*, and *runt* in the spider *Cupiennius salei* imply that these genes were segmentation genes in a basal arthropod. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9), S. 4515-4519. doi:10.1073/pnas.97.9.4515
- Dearden, P. K., Akam, M.** (2001) Early embryo patterning in the grasshopper, *Schistocerca gregaria*: *wingless*, *decapentaplegic* and *caudal* expression. *Development*, 128(18), S. 3435-3444.
- Dohle, W.** (1970) Die Bildung und Differenzierung des postnauplialen Keimstreifs von *Diastylis rathkei* (Crustacea, Cumacea). I. Die Bildung der Teloblasten und ihrer Derivate. *Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere*, 67(4), S. 307-392. doi:10.1007/BF00277503
- Dohle, W.** (1972) Über die Bildung und Differenzierung des postnauplialen Keimstreifs von *Leptochelia* spec. (Crustacea, Tanaidacea).

Zoologische Jahrbücher; Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere, 89, S. 503-566.

- Dohle, W.** (1976) Die Bildung und Differenzierung des postnauplialen Keimstreifs von *Diastylis rathkei* (Crustacea, Cumacea). II. Die Differenzierung und Musterbildung des Ektoderms. Zoomorphologie, 84(3), S. 235-277. doi:10.1007/BF01578696
- Dohle, W., Scholtz, G.** (1988) Clonal analysis of the crustacean segment: The discordance between genealogical and segmental borders. Development, 104, S. 147-160.
- Dohle, W., Scholtz, G.** (1995) Segmentbildung im Keimstreif der Krebse. Biologie in unserer Zeit, 25(2), S. 90-100. doi:10.1002/biuz.19950250208
- Dohle, W., Scholtz, G.** (1997) How far does cell lineage influence cell fate specification in crustacean embryos? Seminars in Cell and Developmental Biology, 8(4), S. 379-390. doi:10.1006/scdb.1997.0162
- Dohle, W., Gerberding, M., Hejzol, A., Scholtz, G.** (2004) Cell lineage, segment differentiation, and gene expression in crustaceans. In: Scholtz, G. (Ed.), Evolutionary Developmental Biology of Crustacea. Lisse: Balkema, A. A., 15, S. 95-133. doi:10.13140/RG.2.1.4984.9841
- Fischer, A. H. L., Pabst, T., Scholtz, G.** (2010) Germ band differentiation in the stomatopod *Gonodactylaceus falcatus* and the origin of the stereotyped cell division pattern in Malacostraca (Crustacea). Arthropod Structure and Development, 39, S. 411-422. doi:10.1016/j.asd.2010.05.006
- Gerberding, M.** (1999) Cell lineage und *engrailed* Expression in der Mittellinie der höheren Krebse *Orchestia cavimana* und *Porcellio scaber*. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin. doi:10.18452/14329

- Gerberding, M., Scholtz, G.** (1999) Cell lineage of the midline cells in the amphipod crustacean *Orchestia cavimana* (Crustacea, Malacostraca) during formation and separation of the germ band. *Development, Genes and Evolution*, 209(2), S. 91-102. doi:10.1007/s004270050231
- Gerberding, M., Scholtz, G.** (2001) Neurons and glia in the midline of the higher crustacean *Orchestia cavimana* are generated via an invariant cell lineage that comprises a median neuroblast and glial progenitors. *Developmental Biology*, 235(2), S. 397-409. doi:10.1006/dbio.2001.0302
- Gerberding, M., Patel, N. H.** (2004) Gastrulation in crustaceans. Germ layers and cell lineages. In: Stern, C. D. (Ed.), *Gastrulation: From Cells to Embryo*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1st edition, S. 79-84.
- Gerberding, M., Browne, W. E., Patel, N. H.** (2002) Cell lineage analysis of the amphipod crustacean *Parhyale hawaiiensis* reveals an early restriction of cell fates. *Development*, 129, S. 5789-5801. doi:10.1242/dev.00155
- Hahnenkamp, L.** (1974) Die Bildung und Differenzierung des Keimstreifens der Asseln (Isopoda) und anderer höherer Krebse. Eine vergleichend-embryologische Studie. Zulassungsarbeit für die erste (wissenschaftliche) Staatsprüfung Berlin.
- Hejzol, A.** (2002) Der postnaupliale Keimstreif von *Porcellio scaber* und *Orchestia cavimana* (Crustacea, Peracarida): Zelllinie, Genexpression und Beginn der Morphogenese. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin. doi:10.18452/14773
- Hejzol, A., Scholtz, G.** (2004) Clonal analysis of *Distal-less* and *engrailed* expression patterns during early morphogenesis of uniramous and biramous crustacean limbs. *Development, Genes and Evolution*, 214(10), S. 473-485. doi:10.1007/s00427-004-0424-2

- Hejnol, A., Schnabel, R., Scholtz, G.** (2006) A 4D-microscopic analysis of the germ band in the isopod crustacean *Porcellio scaber* (Malacostraca, Peracarida) – developmental and phylogenetic implications. *Development, Genes and Evolution*, 216(12), S. 755-767. doi:10.1007/s00427-006-0105-4
- Hertzler, P. L.** (2002) Development of the mesendoderm in the dendrobranchiates shrimp *Sicyonia ingentis*. *Arthropod Structure and Development*, 31(1), S. 33-49. doi:10.1016/S1467-8039(02)00018-X
- Hickman, V. V.** (1937) The embryology of the syncarid crustacean, *Anaspides tasmaniae*. *Papers and Proceedings of the Royal Society of Tasmania*, S. 1-35.
- Hird, S. N., White, J. G.** (1993) Cortical and cytoplasmic flow polarity in early embryonic cells of *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Cell Biology*, 121(6), S. 1343-1355. doi:10.1083/jcb.121.6.1343
- Janssen, R., Le Gouar, M., Pechmann, M., Poulin, F., Bolognesi, R., Schwager, E. E., Hopfen, C., Colbourne, J. K., Budd, G. E., Brown, S. J., Prpic, N.-M., Kosiol, C., Vervoort, M., Damen, W. G. M., Balavoine, G., McGregor, A. P.** (2010) Conservation, loss, and redeployment of Wnt ligands in protostomes: Implications for understanding the evolution of segment formation. *Biomedcentral, Evolutionary Biology*, 10(374). doi:10.1186/1471-2148-10-374
- Jirikowski, G. J., Wolff, C., Richter, S.** (2015) Evolution of eumalacostracan development – new insights into loss and reacquisition of larval stages revealed by heterochrony analysis. *Biomedcentral, EvoDevo*, 6(1), 4. doi:10.1186/2041-9139-6-4
- Kao, D., Lai, A. G., Stamatakis, E., Rosic, S., Konstantinides, N., Jarvis, E., Di Donfrancesco, A., Pouchkina-Stancheva, N., Sémon, M., Grillo, M., Bruce, H., Kumar, S., Siwanowicz, I., Le, A., Lemire, A., Eisen, M. B., Extavour, C., Browne, W. E., Wolff, C., Averof, M., Patel, N. P., Sarkies, P., Pavlopoulos, A., Aboobaker, A.**

- (2016) The genome of the crustacean *Parhyale hawaiiensis*, a model for animal development, regeneration, immunity and lignocellulose digestion. eLife 5: e20062. doi:10.7554/eLife.20062
- Kontarakis, Z., Pavlopoulos, A.** (2014) Transgenesis in non-model organisms: The case of *Parhyale*. In: Graba, Y., Rezsohazy, R. (Ed.), Hox Genes: Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York, 1196, S. 145-181. doi:10.1007/978-1-4939-1242-1_10
- Lev, O.** (2018) *Porcellio scaber* as a new model animal for the study of evolution of segmentation in arthropods. Masterarbeit, Hebrew University of Jerusalem.
- Liu, P. Z., Kaufman, T. C.** (2004) *hunchback* is required for suppression of abdominal identity, and for proper germband growth and segmentation in the intermediate germband insect *Oncopeltus fasciatus*. Development, 131(7), S. 1515-1527. doi:10.1242/dev.01046
- Liu, P. Z., Kaufman, T. C.** (2005) Short and long germ segmentation: Unanswered questions in the evolution of a developmental mode. Evolution and Development, 7(6), S. 629-646. doi:10.1111/j.1525-142X.2005.05066.x
- Manton, S. M.** (1928) On the embryology of a mysid crustacean *Hemimysis lamorae*. Philosophical Transactions of the Royal Society B, 216(438), S. 363-463. doi:10.1098/rstb.1928.0008
- Manton, S. M.** (1934) On the embryology of *Nebalia bipes*. Philosophical Transactions of the Royal Society of London B, 223(498), S. 168-238. doi:10.1098/rstb.1934.0005
- Mayer, G., Kato, C., Quast, B., Chisholm, R. H., Landman, K. A., Quinn, L. M.** (2010) Growth patterns in Onychophora (velvet worms): Lack of a localised posterior proliferation zone. Biomedcentral, Evolutionary Biology, 10(339). doi:10.1186/1471-2148-10-339

- McMurrich, J. P.** (1892) The formation of the germ-layers in the isopod Crustacea. *Zoologischer Anzeiger*, 15, S. 271-275.
- McMurrich, J. P.** (1895) Embryology of the isopod Crustacea. *Journal of Morphology*, 11, S. 63-154.
- Milatovič, M., Kostanjšek, R., Štrus, J.** (2010) Ontogenetic development of *Porcellio scaber*. Staging based on microscopic anatomy. *Journal of Crustacean Biology*, 30(2), S. 225-235. doi:10.1651/09-3189.1
- Mitchison, T. J., Sedat, J.** (1983) Localization of antigenic determinants in whole *Drosophila* embryos. *Developmental Biology*, 99(1), S. 261-264. doi:10.1016/0012-1606(83)90275-0
- Nair, K. B.** (1939) The reproduction, oogenesis and development of *Mesopodopsis orientalis* Tatt. *Proceedings of the Indian Academy of Science B*, 9(4), S. 175-223. doi:10.1007/BF03049623
- Nair, K. B.** (1941) On the embryology of *Squilla*. *Proceedings of the Indian Academy of Science B*, 14(6), S. 543-576. doi:10.1007/BF03051469
- Nair, K. B.** (1948) On the embryology of *Caridina laevis* Heller. *Proceedings of the Indian Academy of Science B*, 29(6), S. 211-288. doi:10.1007/BF03049969
- Nair, S. G.** (1956) On the Embryology of the isopod *Irona*. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 4(1), S. 1-33.
- Ōishi, S.** (1959) Studies on the teloblasts in the decapod embryo. I. Origin of teloblasts in *Heptacarpus rectirostris* Stimpson. *Embryologia*, 4(4), S. 283-309.
- Ōishi, S.** (1960) Studies on the teloblasts in the decapod embryo. II. Origin of teloblasts in *Pagurus samuelis* (Stimpson) and *Hemigrapsus sanguineus* (de Haan). *Embryologia*, 5(3), S. 270-282.

- Patel, N. P.** (1994) The evolution of arthropod segmentation: Expression patterns. *Development*, 1994, S. 201-207.
- Patel, N. P., Schafer, B., Goodman, C. S., Holmgren, R.** (1989) The role of segment polarity genes during *Drosophila* neurogenesis. *Genes and Development*, 3(6), S. 890-904. doi:10.1101/gad.3.6.890
- Peel, A., Akam, M.** (2003) Evolution of Segmentation: Rolling Back the Clock. *Current Biology*, 13(18), S. R708-R710. doi:10.1016/S0960-9822(03)00647-X
- Peel, A., Chipman, A. D., Akam, M.** (2005) Arthropod segmentation: Beyond the *Drosophila* paradigm. *Nature Reviews Genetics*, 6(12), S. 905-916. doi:10.1038/nrg1724
- Pietzsch, T., Saalfeld, S., Preibisch, S., Tomancak, P.** (2015) BigDataViewer: Visualization and processing for large image data sets. *Nature Methods*, 12(6), S. 481-483. doi:10.1038/nmeth.3392
- Psycharakis, S., Zacharopoulos, A., Ripoll, J., Zacharakis, G., Riekher, M., Tavernarakis, N.** (2014) Optical projection tomography and light sheet microscopy for imaging in biological specimens – A comparison study. In 2014 IEEE International Conference on Imaging Systems and Techniques (IST) Proceedings, Santorini, S. 211-215. doi:10.1109/IST.2014.6958475
- Reichenbach, H.** (1888) Zur Embryonalentwicklung des Flußkrebse. *Abhandlungen der Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung*, 14, S. 1-137.
- Reinhard, W.** (1887) Zur Ontogenie des *Porcellio scaber*. *Zoologischer Anzeiger*; VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 10, S. 9-13.
- Roule, L.** (1891) Sur le développement des feuillets blastodermiques chez les Crustacés isopodes (*Porcellio scaber*). *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, Paris, 112, S. 1460-1462.

- Scheidegger, G.** (1976) Stadien der Embryonalentwicklung von *Eupagurus prideauxi* Leach (Crustacea, Decapoda, Anomura), unter besonderer Berücksichtigung der Darmentwicklung und der am Dotterabbau beteiligten Zelltypen. Zoologische Jahrbücher; Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere, 95, S. 297-353.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A.** (2012) Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. Nature Methods, 9(7), S. 676-682. doi:10.1038/nmeth.2019
- Schnabel, R., Hutter, H., Moerman, D., Schnabel, H.** (1997) Assessing normal embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* using a 4D microscope: Variability of development and regional specification. Developmental Biology, 184(2), S. 234-265. doi:10.1006/dbio.1997.8509
- Scholl, G.** (1963) Embryologische Untersuchungen an Tanaidaceen. Zoologische Jahrbücher; Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere, 80, S. 500-554.
- Scholtz, G.** (1984) Untersuchungen zur Bildung und Differenzierung des postnauplialen Keimstreifs von *Neomysis integer* Leach (Crustacea, Malacostraca, Peracarida). Zoologische Jahrbücher; Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere, 112, S. 295-349.
- Scholtz, G.** (1990) The formation, differentiation and segmentation of the post-naupliar germ band of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea, Malacostraca, Peracarida). Proceedings of the Royal Society London B, 239(1295), S. 163-211. doi:10.1098/rspb.1990.0013
- Scholtz, G.** (1992) Cell lineage studies in the crayfish *Cherax destructor* (Crustacea, Decapoda): Germ band formation, segmentation, and

early neurogenesis. Roux's Archives of Developmental Biology, 202(1), S. 36-48. doi:10.1007/BF00364595

Scholtz, G. (2000) Evolution of the nauplius stage in malacostracan crustaceans. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 38(3), S. 175-187. doi:10.1046/j.1439-0469.2000.383151.x

Scholtz, G. (2002) The Articulata hypothesis – Or what is a segment? Organisms, Diversity and Evolution, 2(3), S. 197-215. doi:10.1078/1439-6092-00046

Scholtz, G., Dohle, W. (1996) Cell lineage and cell fate in crustacean embryos – A comparative approach. The International Journal of Developmental Biology, 40(1), S. 211-220.

Scholtz, G., Kawai, T. (2002) Aspects of embryonic and postembryonic development of the Japanese freshwater crayfish *Cambaroides japonicus* (Crustacea, Decapoda) including a hypothesis on the evolution of maternal care in the Astacida. Acta Zoologica, Stockholm, 83(3), S. 203-212. doi:10.1046/j.1463-6395.2002.00113.x

Scholtz, G., Wolff, C. (2002) Cleavage pattern, gastrulation, and germ disc formation of the amphipod crustacean *Orchestia cavimana*. Contributions to Zoology, 71(1-3), S. 9-28. doi:10.1163/18759866-0710103002

Scholtz, G., Wolff, C. (2013) Arthropod embryology: Cleavage and germ band development. In: Minelli, A., Boxshall, G., Fusco, G. (Ed.), Arthropod Biology and Evolution. Springer Press, Berlin, Heidelberg, S. 63-89. doi:10.1007/978-3-642-36160-9_4

Schwentner, M., Richter, S., Rogers, D. C., Giribet G. (2018) Tetraconatan phylogeny with special focus on Malacostraca and Branchiopoda: Highlighting the strength of taxon-specific matrices

in phylogenomics. Proceedings of the Royal Society B, 285: 20181524. doi:10.1098/rspb.2018.1524

Shiino, S. M. (1942) Studies on the embryology of *Squilla oratoria* de Haan. Memoirs of the College of Science; Kyoto Imperial University Series B, 17(1):3, S. 77-174.

Shinmyo, Y., Mito, T., Uda, T., Nakamura, T., Miyawaki, K., Ohuchi, H., Noji, S. (2006) *Brachyenteron* is necessary for morphogenesis of the posterior gut but not for anteroposterior axial elongation from the posterior growth zone in the intermediate-germband cricket *Gryllus bimaculatus*. Development, 133(22), S. 4539-4547. doi:10.1242/dev.02646

Siewing, R. (1969) Lehrbuch der vergleichenden Entwicklungsgeschichte der Tiere. Parey, Hamburg und Berlin.

Stent, G. S. (1985) The role of cell lineage in development. Philosophical Transactions of the Royal Society London B, 312(1153), S. 3-19. doi:10.1098/rstb.1985.0174

Strömberg, J.-O. (1965) On the embryology of the isopod *Idotea*. Arkiv för Zoologi, Stockholm, 17, S. 421-473.

Strömberg, J.-O. (1967) Segmentation and organogenesis in *Limnoria lignorum* (Rathke) (Isopoda). Arkiv för Zoologi, Stockholm, 20, S. 91-139.

Strömberg, J.-O. (1971) Contribution to the embryology of bopyrid isopods with special reference to *Bopyroides*, *Hemiarthrus* and *Pseudione* (Isopoda, Epicaridea). Sarsia, 47(1), S. 1-46. doi:10.1080/00364827.1971.10411191

Strömberg, J.-O. (1972) *Cyathura polita* (Crustacea, Isopoda), some embryological notes. Bulletin of Marine Science, 22(2), S. 463-482.

Sutton, S. (1972) Woodlice. Pergamon Press, Oxford, S. 115.

- Tinevez, J.-Y., Perry, N., Schindelin, J., Hoopes, G. M., Reynolds, G. D., Laplantine, E., Bednarek, S. Y., Shorte, S. L., Eliceiri, K. W.** (2017) TrackMate: An open and extensible platform for single-particle tracking. *Methods*, 115, S. 80-90. doi:10.1016/j.ymeth.2016.09.016
- Tinevez, J.-Y., Pietzsch, T., Rueden, C.** (2018) MaMuT. Github. <https://github.com/fiji/MaMuT>
- Vargas-Vila, M. A., Hannibal, R. L., Parchem, R. J., Liu, P. Z., Patel, N. H.** (2010) A prominent requirement for single-minded and the ventral midline in patterning the dorsoventral axis of the crustacean *Parhyale hawaiiensis*. *Development*, 137(20), S. 3469-3476. doi:10.1242/dev.055160
- Vehling, D.** (1994) Die Entwicklung des postnauplialen Keimstreifs von *Porcellio scaber*. Eine zellgenealogische Studie. Diplomarbeit, Freie Universität Berlin.
- Weldon, W. F. R.** (1892) The formation of the germ layers in *Crangon vulgaris*. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 33, S. 343-363.
- Weygoldt, P.** (1958) Die Embryonalentwicklung des Amphipoden *Gammarus pulex pulex* (L.). *Zoologische Jahrbücher; Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere*, 77, S. 51-110.
- Weygoldt, P.** (1960a) „Mehrphasige Gastrulation bei Arthropoden“. *Zoologischer Anzeiger*, 164, 7/10, S. 381-385.
- Weygoldt, P.** (1960b) Beitrag zur Kenntnis der Malakostrakenentwicklung. Die Keimblätterbildung bei *Asellus aquaticus* (L.). *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, 163, S. 340-354.
- Weygoldt, P.** (1961) Beitrag zur Kenntnis der Ontogenie der Dekapoden: Embryologische Untersuchungen an *Palaemonetes varians* Leach. *Zoologische Jahrbücher; Abteilung für Anatomie und Ontogenie der Tiere*, 79, S. 223-270.

- Wolff, C.** (2009) The embryonic development of the malacostracan crustacean *Porcellio scaber* (Isopoda, Oniscidea). *Development, Genes and Evolution*, 219(11-12), S. 545-564. doi:10.1007/s00427-010-0316-6
- Wolff, C., Scholtz, G.** (2002) Cell lineage, axis formation, and the origin of germ layers in the amphipod crustacean *Orchestia cavimana*. *Developmental Biology*, 250(1), S. 44-58. doi:10.1006/dbio.2002.0789
- Wolff, C., Gerberding, M.** (2015) "Crustacea": Comparative aspects of early development. In: Wanninger, A. (Ed.), *Evolutionary Developmental Biology of Invertebrates 4: Ecdysozoa II: Crustacea*. Springer, Vienna, S. 39-61. doi:10.1007/978-3-7091-1853-5_2
- Wolff, C., Schröder, R., Schulz, C., Tautz, D., Klingler, M.** (1998) Regulation of the *Tribolium* homologues of *caudal* and *hunchback* in *Drosophila*: Evidence for maternal gradient systems in a short germ embryo. *Development*, 125(18), S. 3645-3654.
- Wolff, C., Tinevez, J.-Y., Pietzsch, T., Stamatakis, E., Harich, B., Guignard, L., Preibisch, S., Shorte, S., Keller, O. J., Tomancak, P., Pavlopoulos, A.** (2018) Multi-view light-sheet imaging and tracking with the MaMuT software reveals the cell lineage of a direct developing arthropod limb. *eLife* 7: e34410. doi:10.7554/eLife.34410
- Zilch, R.** (1978) Embryologische Untersuchungen an der holoblastischen Ontogenese von *Penaeus trisulcatus* Leach (Crustacea, Decapoda). *Zoomorphologie*, 90(1), S. 67-100. doi:10.1007/BF00993744

6. ANHANG

6.1 Datenanalyse mit FIJI (MaMuT)

1. Die .lwf Originaldaten mittels ACDSee v3.1. (ACD Systems) in das Datenformat .tif konvertieren, dazu alle Einzelbilder markieren → Extras → konvertieren auswählen, Bildformat und Zielordner wählen → OK
2. Mit dem Programm „Bulk Rename Utility“ von TGRMN alle Dateien umbenennen: Scandatum_Zeitpunkt t_Fokusebene z
3. Nun alle Einzelbilder mit dem PlugIn Bio-Formats Importer in FIJI als Hyperstack (Display metadata, Group files with similar names, Use virtual stack, Split channels) öffnen, unter den Voreinstellungen geht ein Fenster mit zwei Schieberegler für die Zeit und Fokusebene auf
4. Über das PlugIn Bio-Formats Exporter können alle Fokusebenen für einen einzelnen Zeitpunkt in eine kompakte Datei zusammengeführt werden (Scandatum_Zeitpunkt T)
5. Mit dem PlugIn Multiview Reconstruction → Batch Processing → Define Multi-View Dataset werden alle Zeitpunkte in eine neue XML-Datei zusammengeschrieben
6. Die XML-Datei muss noch ein weiteres Mal mit dem PlugIn Multiview Reconstruction → Batch Processing → Resave → As HDF5 gespeichert werden
7. Für die finale Auswertung wird die HDF5/XML-Datei im PlugIn MaMuT → Launch new MaMuT annotation geöffnet und als mamut.xml-Datei gespeichert (nach Pietzsch et al. 2015; Tinevez et al. 2017, 2018)
8. Mit dem Massive Multi-view Tracker (MaMuT) können über das implementierte Werkzeug (Actions) „Close gaps by introducing new spots“ die einzelnen Zellen manuell oder halbautomatisch in ihrer Fokusebene (z-Achse) markiert und, über die Zeitachse, ihre Position sowie ihr Teilungsverhalten analysiert werden (ABBILDUNG 3, Wolff et al. 2018)

Bei 4D-Aufnahmen mit vielen z-Ebenen und Zeitpunkten erleichtert die halbautomatische Markierung den Arbeitsprozess, indem sie die Lücken zwischen den lückenhaft markierten Zellen unter Anwendung eines Algorithmus schließt.

6.2 Erklärungen zu den Aufnahmen

Aufnahme 1: Frühe Furchung bis zur Keimscheibenbildung bei *Porcellio scaber*. Die Injektion des Vitalfarbstoffes Alexa Fluor 488 erfolgte in einem S2 Stadium. Der Farbstoff lagert sich im sich verdichtenden Zellplasma um die Zellkerne an und markiert so die Zellkerne des Eies. Das Video zeigt die 5. synchrone Teilung der frühen Furchung, die 6. Teilung (asynchron) sowie die Bildung der Zellmembranen und die Bildung der Keimscheibe an einem Eipol. Alle fünf Minuten wurde ein z-Stapel aus 14 Einzelbildern mit dem Fluoreszenzstereomikroskop Lumar.V12 generiert. Das Video wurde mit 30 Bildern pro Sekunde erstellt.

Aufnahme 2: Embryo A – Gastrulation bis zur Verlängerung des Keimstreifens bei *Porcellio scaber*. Die Injektion des Vitalfarbstoffes Tetramethylrhodamin erfolgte während des S3/S4 Stadiums. Der Farbstoff lagert sich im Zellplasma der Zellen an und markiert so die Zellen des Embryos. Das Video zeigt die Gastrulation, die Bildung der Ektoteloblasten und den Beginn der Verlängerung des Keimstreifens bis zur Bildung der zweiten e-Reihe. Alle 15 Minuten wurde ein z-Stapel aus 40 Einzelbildern mit dem Axioplan 2 Imaging- Mikroskop generiert. Das Video wurde mit 30 Bildern pro Sekunde erstellt.

Aufnahme 3: Embryo A – 3D Viewer Darstellung. Die Zellen des Embryos wurden mit dem FIJI PlugIn MaMuT markiert und entsprechend ihres Zellschicksals unterschiedlich

eingefärbt (siehe KAPITEL 3.1). Es sind die gleichen Entwicklungsprozesse wie in Aufnahme 2 dargestellt. Das Video wurde mit vier Bildern pro Sekunde erstellt.

Aufnahme 4: Embryo B – Gastrulation bis zur Verlängerung des Keimstreifens bei *Porcellio scaber*. Die Injektion des Vitalfarbstoffes Tetramethylrhodamin erfolgte während des S4 Stadiums. Das Video zeigt die Gastrulation, die Bildung der Ektoteloblasten und den Beginn der Verlängerung des Keimstreifens bis zur Bildung der dritten e-Reihe. Alle 30 Minuten wurde ein z-Stapel aus 40 Einzelbildern mit dem Axioplan 2 Imaging- Mikroskop generiert. Das Video wurde mit 30 Bildern pro Sekunde erstellt.

Aufnahme 5: Embryo B – 3D Viewer Darstellung. Die Zellen des Embryos wurden mit dem FIJI PlugIn MaMuT markiert und entsprechend ihres Zellschicksals unterschiedlich eingefärbt (siehe KAPITEL 3.1). Es sind die gleichen Entwicklungsprozesse wie in Aufnahme 4 dargestellt. Das Video wurde mit sieben Bildern pro Sekunde erstellt.

Aufnahme 6: Embryo C – Gastrulation bis zur Verlängerung des Keimstreifens bei *Porcellio scaber*, Datenset von Dr. Carsten Wolff (erstellt 2011). Das Video zeigt die Gastrulation, die Bildung der Ektoteloblasten und den Beginn der Verlängerung des Keimstreifens bis zur Bildung der zweiten e-Reihe eines ungefärbten Embryos. Alle 1,5 Minuten wurde ein z-Stapel aus 15 Einzelbildern mit dem Axioplan 2 Imaging- Mikroskop generiert. Das Video wurde mit 30 Bildern pro Sekunde erstellt.

Aufnahme 7: Embryo C – 3D Viewer Darstellung. Die Zellen des Embryos wurden mit dem FIJI PlugIn MaMuT markiert und entsprechend ihres Zellschicksals unterschiedlich eingefärbt (siehe KAPITEL 3.1). Es sind die gleichen

Entwicklungsprozesse wie in Aufnahme 6 dargestellt. Das Video wurde mit vier Bildern pro Sekunde erstellt.

Aufnahme 8: Embryo D – 3D Viewer Darstellung, basierend auf Aufnahme 1 aus Hejnal (2002). Die Zellen des Embryos wurden mit dem FIJI Plugin MaMuT markiert und entsprechend ihres Zellschicksals unterschiedlich eingefärbt (siehe KAPITEL 3.1). Das Video zeigt die Entwicklung von der Gastrulation bis zur Verlängerung des Keimstreifens bei *Porcellio scaber*. Das Video wurde mit 30 Bildern pro Sekunde erstellt.

6.3 Zellteilungsmuster der Ektoteloblasten

TABELLE A11: Teilungsmuster der Ektoteloblasten aller Embryonen. Das Muster wird wie in der Spalte „Ektoteloblasten“ in TABELLE 4 angegeben. Fett sind die Ektoteloblasten der linken Körperseite (abgekürzt mit (l)), unterstrichen sind die der Rechten hervorgehoben (abgekürzt mit (r)). Gelb und grau hinterlegt ist der mittlere Ektoteloblast ET₀.

	A	B	C	1	2	3	4	5	6	7	8
ETs	(l)2, (l)3	(r)2	(l)2	(r)2	(r)1	(l)1, (r)3	(r)1	(l)1	(l)1,(l)2	(r)3	(l)2,(r)1, (r)2
	(l)1	(l)2	(l)3	(r)3	(l)2, (l)3	(l)2, (r)4	(r)2	(r)1,(r)2	(l)3,(l)4, (r)2	(l)2	(l)1
	(l)4	(l)3	(l)1	(r)1	(l)4, (r)2	(r)2	(l)2	(l)2	(r)3	(l)1,(l)3	(l)3
	(l)5	(l)1	(l)5	(l)2,(l)3	(r)3	(r)1	(r)4	(l)3,(l)4,(r)3	(r)4	(l)4,(r)2, (r)4	(l)4,(r)3
	0	(r)3	(r)1	(r)4,(r)5	(l)1, (r)4	(r)5	(l)1	0	(r)5,(r)6	(r)5	(l)5
	(r)1	(l)4,(r)4	(r)5	(l)1,(l)4	(r)5, (r)6	(r)6	(r)3		(l)5,(r)1	(l)5,(l)6	(l)6,(r)4, (r)5
	(r)2	(r)5	(l)4	(l)5	0	0	(l)3		0	(r)6,0	(l)8
	(l)8	(r)1	(r)2	(l)6,(l)8,0	(l)5	(r)7	(r)5		(l)1,(l)2	(r)7	(l)7
	(l)6	(l)5	0	(l)7,(l)9	(l)6		(r)6		(l)3,(r)3	(r)8	(r)6,0
	(r)3	(r)7,0	(r)3		(l)7		(l)4		(l)4,(r)2	(r)9	(r)7
	(l)1, (r)4	(r)8	(r)4				(l)7		(r)4	(r)3	(r)8
	(l)2	(r)6	(r)6				(l)5		(r)1,(r)5	(l)1,(l)2, (l)3,(l)4, (r)2,(r)5	(r)1
	(l)3	(l)6,(l)7	(l)7				(r)7		(l)5	(r)4	(r)2
	(l)4	(l)2	(l)6				(l)6,0		(r)6	(r)1	(l)1+(l)2
	(l)5	(l)3,(r)2	(l)8				(r)8		0	(l)5,(l)6	(l)3
	0	(l)1	(l)3				(l)8		(l)1,(l)2	(r)6,0	(r)3
	(r)1	(r)3	(l)2				(r)9		(l)3	(r)7,(r)8	(l)4
	(l)6	(r)4	(l)1, (l)5				(r)10		(l)4,(r)2, (r)3	(r)9	(l)5,0
		(l)5,(r)1, (r)5	(r)1						(r)4	(l)2,(r)2, (r)3	(r)4
		0	(l)4,0						(r)1	(l)1,(l)3, (l)4,(r)1, (r)5	(l)6,(r)5
		(l)4,(r)6	(r)2						(r)5	(l)5,0	(l)7,(l)8
		(l)6,(l)7, (r)7	(r)3						(l)5	(l)6,(r)6	(r)6
		(l)8	(l)7						(r)6	(r)7,(r)8	(r)7
		(l)2	(l)6						0	(r)9	(l)1,(l)2, (r)1,(r)2, (r)8
		(l)3	(l)8						(l)1	(r)2,(r)3	(l)3
		(l)1							(l)2	(l)1,(l)2, (l)3,(r)1	(r)3
		(r)2							(l)3	(r)4,(r)7	
		(r)1,(r)3, (r)4							(l)4,(r)2	(r)5,(r)8, (r)9,0	
									(r)1	(l)5	
									(r)3	(l)1,(l)6, (r)6	
									(r)4		
									(r)5		
									(l)5		

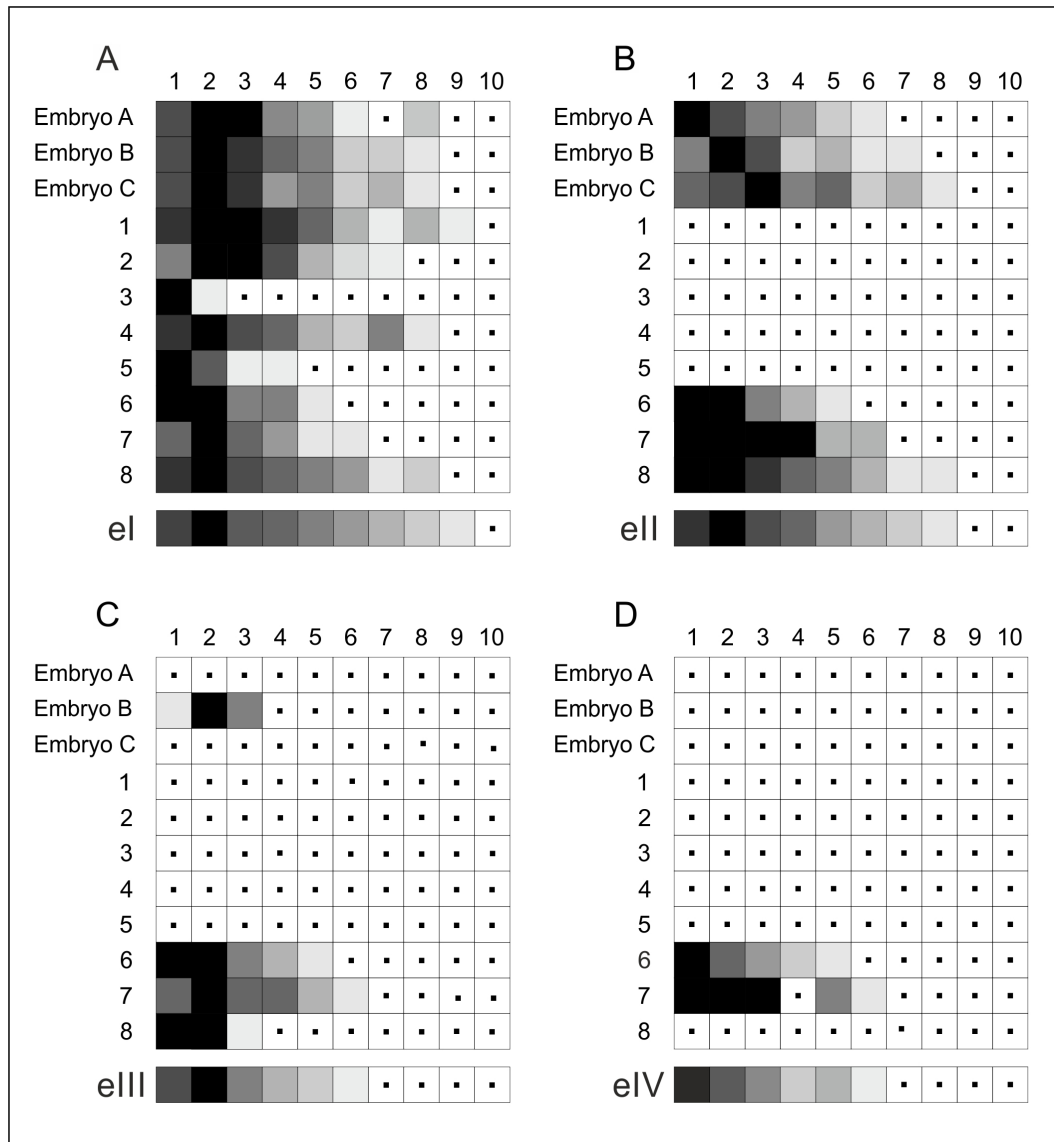


ABBILDUNG A21: Teilungsmuster der Ektoteloblasten der linken Körperseite. Dargestellt sind die Teilungsabfolgen aller Embryonen sowie eine daraus abgeleitete durchschnittliche Teilungsabfolge für die Bildung der ersten bis vierten e-Reihe, die als Summe aus den Positionen der einzelnen Ektoteloblasten in der Teilungswelle ermittelt wurde. **A:** Bildung der ersten e-Reihe (el); **B:** Bildung der zweiten e-Reihe (ell); **C:** Bildung der dritten e-Reihe (eIII); **D:** Bildung der vierten e-Reihe (eIV). Die verschiedenen Graustufen beschreiben wie in ABBILDUNG 13 den Zeitpunkt in der Teilungsabfolge vom ersten sich teilenden Ektoteloblast (schwarz) bis zum letzten sich teilenden Ektoteloblasten (hellgrau), weiße Kästchen mit einem Punkt markieren fehlende Daten.

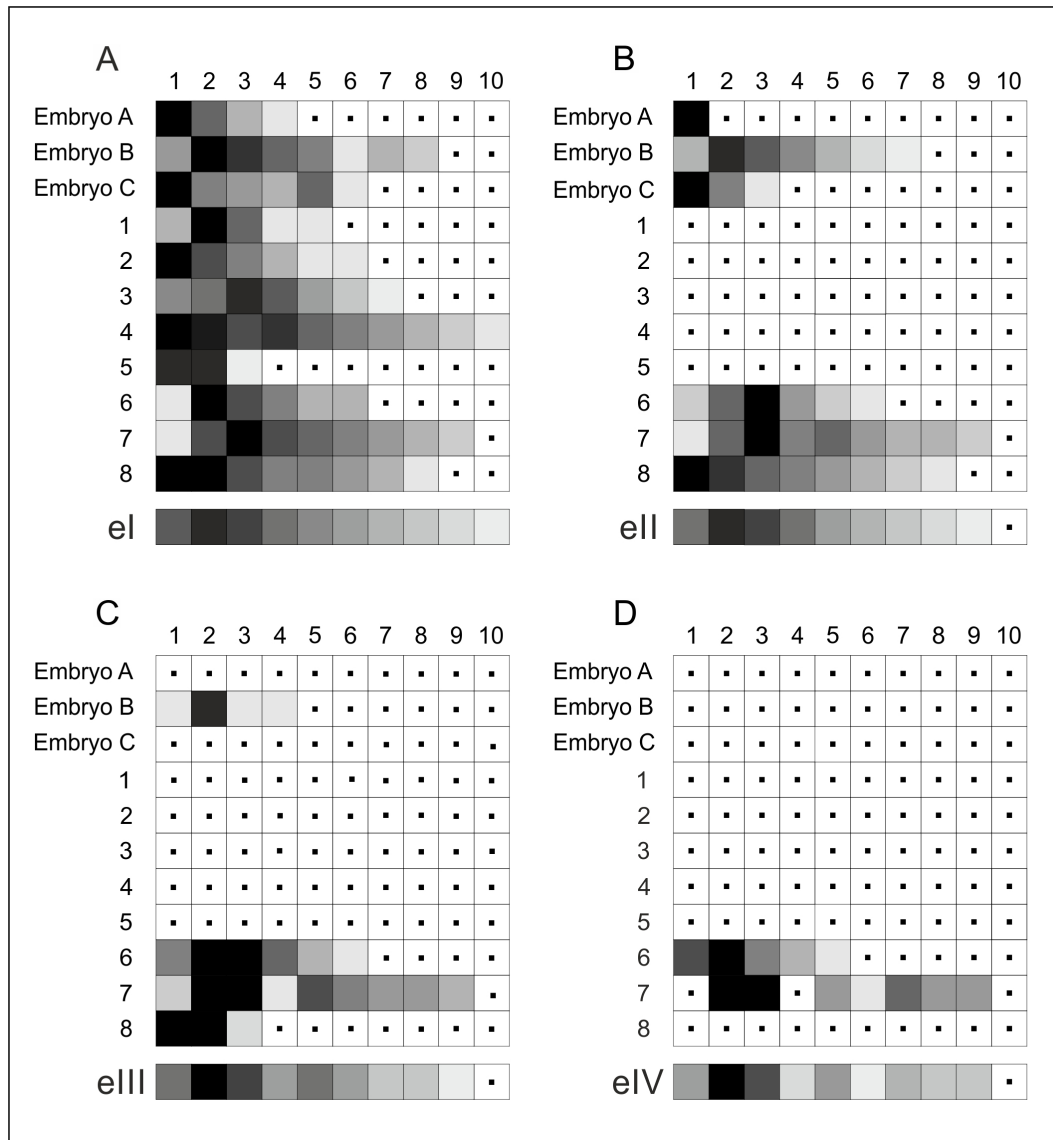


ABBILDUNG A22: Teilungsmuster der Ektoteloblasten der rechten Körperseite. Dargestellt sind die Teilungsabfolgen aller Embryonen sowie eine daraus abgeleitete durchschnittliche Teilungsabfolge für die Bildung der ersten bis vierten e-Reihe, die als Summe aus den Positionen der einzelnen Ektoteloblasten in der Teilungswelle ermittelt wurde. **A:** Bildung der ersten e-Reihe (el); **B:** Bildung der zweiten e-Reihe (ell); **C:** Bildung der dritten e-Reihe (elll); **D:** Bildung der vierten e-Reihe (elV). Die verschiedenen Graustufen beschreiben wie in ABBILDUNG 13 den Zeitpunkt in der Teilungsabfolge vom ersten sich teilenden Ektoteloblast (schwarz) bis zum letzten sich teilenden Ektoteloblasten (hellgrau), weiße Kästchen mit einem Punkt markieren fehlende Daten.

6.4 Zellteilungsmuster in der Reihe AB

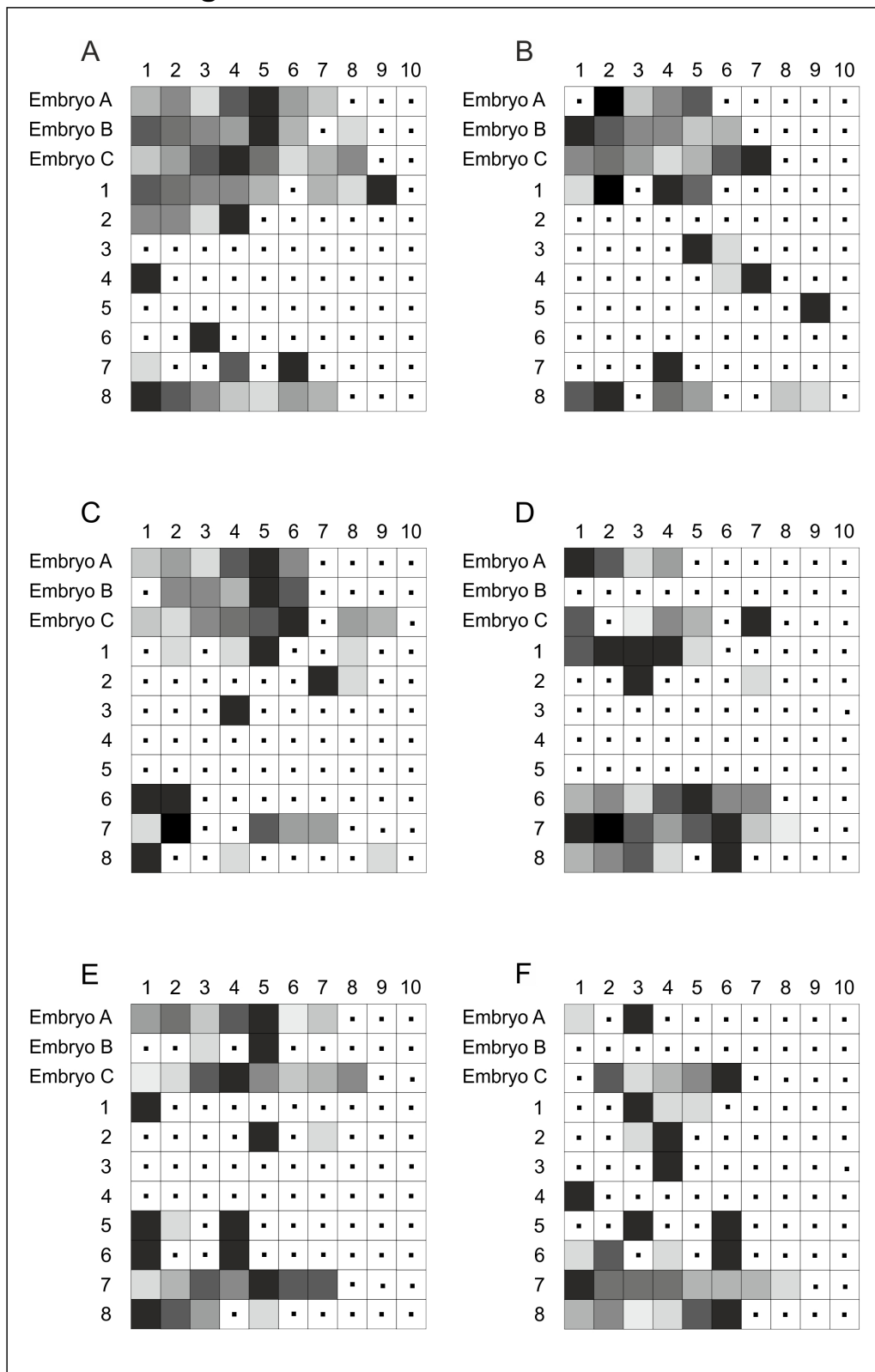


ABBILDUNG A23: Teilungsmuster der Reihe AB sowie der Reihen A und B beider Körperseiten aller Embryonen. A, C und E zeigen die linke Körperseite, B, D und F die rechte Körperseite. (A, B) Teilung der Reihe AB; (C, D) Teilung der Reihe A; (E, F) Teilung der Reihe B. Die verschiedenen Graustufen beschreiben wie in ABBILDUNG 13 den Zeitpunkt in der Teilungsabfolge von der ersten sich teilenden Zelle der Reihe (schwarz) bis zur letzten sich teilenden Zelle der Reihe (hellgrau), weiße Kästchen mit einem Punkt markieren fehlende Daten.

7. DANKSAGUNG

Ich danke von Herzen Prof. Dr. Gerhard Scholtz für die Möglichkeit zur Promotion in seiner Arbeitsgruppe an der Humboldt-Universität zu Berlin, für die wissenschaftlichen Herausforderungen, an denen ich als Wissenschaftler gewachsen bin, und für seine gute Betreuung. Dr. Carsten Wolff danke ich für die Einarbeitung in die Techniken der Entwicklungsbiologie und für die Betreuung des gemeinsamen Projektes. Beiden danke ich vor allem, dass sie ihr Fachwissen und hilfreiche Tricks mit mir geteilt haben.

Außerdem möchte ich mich von Herzen bei Kersten Träder (Pflanzenphysiologie, Humboldt-Universität zu Berlin) für die Einweisung in molekularbiologische Methoden und bei Prof. Dr. Bernhard Grimm für die Erlaubnis zur Nutzung seines Labors und seiner Mikroskope bedanken.

Ich danke den Mitarbeitern und Studenten sowie allen Ehemaligen der Arbeitsgruppe Vergleichende Zoologie an der Humboldt-Universität zu Berlin für eine wunderbare Zeit mit vielen anregenden Diskussionen, gemeinsamen Tagungen und allem anderen, was zum Alltag eines Doktoranden gehört.

Für immer wieder aufbauende Worte, hilfreiche Diskussionen und dem Gefühl, dass ich nicht der einzige Mensch auf Erden bin, der sich für die Kellerrassel interessiert, bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe Developmental and Evolutionary Biology von Prof. Dr. Ariel D. Chipman an der Hebrew University of Jerusalem. Es war eine tolle Zeit sowohl hier in Berlin als auch auf Tagungen und in Jerusalem.

Außerdem möchte ich die Chance wahrnehmen und auch den Entwicklern von Open-Source-Programmen und Plugins danken, ohne die diese Dissertation nicht entstanden wäre.

Mein größter Dank gilt jedoch Christin Wittfoth für die Ermutigung dranzubleiben und ihren hilfreichen Kommentaren, die meine Ansichten und die Einstellung zu meinen Daten maßgeblich verbessert haben.

Meiner Familie und Freunden danke ich von Herzen, dass sie mir zu den notwendigen kreativen Pausen verholfen, mich motiviert und mental aufgebaut haben sowie stets an mich geglaubt haben. Vor allem möchte ich Martin dabei erwähnen, der meinen Eifer zum Abschluss akzeptiert und mir die dazu notwendige Zeit eingeräumt hat.

Ich bedanke mich ebenfalls bei den Gutachtern für die Einschätzung meiner Arbeit und bei der Einstein Stiftung zu Berlin für die dreijährige Förderung innerhalb des Projektes „Evolution der Achsenverlängerung der Arthropoden“ (Projektnummer: A-2012-114).



Einstein Stiftung Berlin
Einstein Foundation Berlin

8. SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich, Franziska Schneider (geborene Meusel), dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen erarbeitet und verfasst habe. Diese Arbeit wurde keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, 20. September 2019

Franziska Schneider